

25 OCT. 2004

PEC'D 18 JAN 2005  
INPI PCT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 16 SEP. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

#### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITE

26bis, rue de Saint-Pétersbourg  
75800 Paris Cédex 08  
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livreVI

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

<b>DATE DE REMISE DES PIÈCES:</b> <b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL:</b> <b>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT:</b> <b>DATE DE DÉPÔT:</b>	Jean LEHU BREVATOME 3, rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS France
Vos références pour ce dossier: B 14404 EE DD 2564	

<b>1 NATURE DE LA DEMANDE</b>			
Demande de brevet			
<b>2 TITRE DE L'INVENTION</b>			
PROCEDE DE REPARTITION DE GOUTTES D'UN LIQUIDE D'INTERET SUR UNE SURFACE			
<b>3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE</b>		Pays ou organisation	Date
			N°
<b>4-1 DEMANDEUR</b>			
Nom		COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE	
Rue		31-33, rue de la Fédération	
Code postal et ville		75752 PARIS 15ème	
Pays		France	
Nationalité		France	
Forme juridique		Etablissement Public de Caractère Scientifique, technique et Ind	
<b>4-2 DEMANDEUR</b>			
Nom		BIOMERIEUX SA	
Rue		Chemin de l'Orme	
Code postal et ville		69280 MARCY L'ETOILE	
Pays		France	
Nationalité		France	
Forme juridique		Société anonyme	

<b>5A MANDATAIRE</b>			
Nom Prénom Qualité Cabinet ou Société Rue Code postal et ville N° de téléphone N° de télécopie Courrier électronique	LEHU Jean Liste spéciale: 422-5 S/002, Pouvoir général: 7068 BREVATOME 3, rue du Docteur Lancereaux 75008 PARIS 01 53 83 94 00 01 45 63 83 33 brevets.patents@brevalex.com		
<b>6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS</b>		Fichier électronique	Pages
Texte du brevet Dessins Désignation d'inventeurs Pouvoir général		texlebrevet.pdf dessins.pdf	65 5
<b>Détails</b> D 57, R 7, AB 1 page 5, figures 11, Abrégé: page 1, Fig.1			
<b>7 MODE DE PAIEMENT</b>			
Mode de paiement Numéro du compte client	Prélèvement du compte courant 024		
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>			
Etablissement immédiat			
<b>9 REDEVANCES JOINTES</b>		Devise	Taux
062 Dépôt		EURO	0.00
063 Rapport de recherche (R.R.)		EURO	320.00
068 Revendication à partir de la 11ème		EURO	15.00
Total à acquitter		EURO	20.00
			0.00
			320.00
			300.00
			620.00

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.  
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Signé par

Signataire: FR, Brevatome, J.Lehu

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)



## BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

### Réception électronique d'une soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou de certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été attribués automatiquement.

Demande de brevet : X

Demande de CU :

<b>DATE DE RECEPTION</b>	31 octobre 2003	
<b>TYPE DE DEPOT</b>	INPI (PARIS) - Dépôt électronique	Dépôt en ligne: X
<b>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI</b>	0350763	Dépôt sur support CD:
<b>Vos références pour ce dossier</b>	B 14404 EE DD 2564	

#### DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale	COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE
Nombre de demandeur(s)	2
Pays	FR

#### TITRE DE L'INVENTION

PROCEDE DE REPARTITION DE GOUTTES D'UN LIQUIDE D'INTERET SUR UNE SURFACE

#### DOCUMENTS ENVOYES

package-data.xml	Requetefr.PDF	fee-sheet.xml
Design.PDF	ValidLog.PDF	textebrevet.pdf
FR-office-specific-info.xml	application-body.xml	request.xml
dessins.pdf	indication-bio-deposit.xml	

#### EFFECTUE PAR

Effectué par:	J.Lehu
Date et heure de réception électronique:	31 octobre 2003 15:52:17
Empreinte officielle du dépôt	6F:40:7E:42:C6:B8:10:99:39:91:F7:4A:A3:A1:C0:23:BB:72:98:7A

/ INPI PARIS, Section Dépôt /

SIEGE SOCIAL  
INSTITUT 28 bis, rue du Saint Petersbourg  
NATIONAL DE 75600 PARIS cedex 03  
LA PROPRIETE Télephone : 01 53 04 53 04  
INDUSTRIELLE Télécopie : 01 42 83 59 30

PROCEDE DE REPARTITION DE GOUTTES D'UN LIQUIDE  
D'INTERET SUR UNE SURFACE

**Domaine technique**

5 La présente invention se rapporte à un procédé de répartition localisée de gouttes d'un liquide d'intérêt sur une surface active, à l'utilisation de ce procédé dans un laboratoire sur puce ou dans un microsystème pour la chimie ou la biologie. La présente 10 invention se rapporte également à des procédés de détection électrique, électrochimique, chimique et optique d'au moins un composé susceptible d'être présent dans une goutte d'un liquide d'intérêt, et à un procédé d'electropolymérisation de molécules présentes 15 dans un liquide d'intérêt.

La présente invention permet d'obtenir une matrice de gouttes localisées, à haute densité, sur une surface, à partir d'un liquide d'intérêt. Elle permet d'assurer facilement la transition d'une chambre 20 fluidique, appelée boîte, et remplie par un liquide d'intérêt à une matrice de gouttes, ou micro-volumes, parfaitement localisées sur une surface placée dans ladite chambre fluidique, lorsque le liquide d'intérêt est évacué de ladite chambre fluidique.

25 Par matrice de gouttes, on entend un arrangement déterminé desdites gouttes, sans qu'une forme géométrique particulière dudit arrangement soit exigée. La matrice de gouttes peut être ronde, carrée, polygonale et même aléatoire, l'essentiel étant que les 30 gouttes formées soient disposées de manière localisée et déterminée sur la surface conformément à l'objectif

atteint par la présente invention. Par localisée, on entend circonscrite, individualisée et distincte des autres gouttes capturées volontairement sur ladite surface grâce au procédé de l'invention.

5 Chacune des gouttes peut être soumise à une ou plusieurs opérations destinées à analyser qualitativement et/ou quantitativement un ou plusieurs analyte(s) présent(s) ou susceptible(s) d'être présent(s) dans le liquide d'intérêt, par exemple une  
10 molécule, un oligonucléotide, une protéine, etc. L'analyse des analytes dans la goutte peut être réalisée par toute technique connue de l'homme du métier pour effectuer des analyses, en particulier dans un volume de liquide aussi réduit qu'une goutte. Il  
15 peut s'agir des techniques d'analyse utilisées sur les puces biologiques. L'analyse peut ou non faire intervenir la surface du dispositif de l'invention recouverte par la goutte, suivant la mise en œuvre de la présente invention.

20 Chacune des gouttes forme un volume dans lequel des réactions chimiques ou biochimiques peuvent être réalisées. Toute réaction chimique ou biochimique connue de l'homme du métier peut être réalisée dans ce volume. Ces réactions peuvent ou non faire intervenir  
25 la surface du dispositif de l'invention recouverte par la goutte, suivant la mise en œuvre de la présente invention. Lorsque ces réactions font intervenir la surface du dispositif de l'invention recouverte par la goutte, elles peuvent le faire avec une seule goutte ou  
30 plusieurs gouttes déposées successivement sur cette surface, ces gouttes successives étant constituées d'un

seul ou de plusieurs liquides d'intérêt différents suivant la mise en œuvre de la présente invention. Un exemple de réactions chimiques faisant par exemple intervenir deux liquides d'intérêt différents sur un 5 dispositif de l'invention est le suivant : au moyen d'une goutte d'un premier liquide d'intérêt, dépôt localisé d'un film d'un polymère organique sur la surface couverte par cette goutte, puis, au moyen d'une goutte d'un deuxième liquide d'intérêt, 10 fonctionnalisation du film polymère organique déposé sur cette surface.

Selon la présente invention, analyse(s) et réaction(s) chimique(s)/biochimique(s) peuvent être mises en œuvre de manière exclusive sur un dispositif 15 conforme à la présente invention (analyse ou réaction), ou de manière complémentaire. Dans ce dernier cas, cela peut être simultanément (réaction et analyse) ou successivement (réaction puis analyse ou analyse puis réaction). En outre, plusieurs analyses et/ou plusieurs 20 réactions peuvent se succéder. Par exemple, le dispositif de la présente invention peut avantageusement intervenir, d'une part dans la fabrication d'une carte, ou laboratoire sur puce (par exemple par des réactions chimiques permettant de 25 déposer un polymère, puis de le fonctionnaliser) (« lab-on-chip »), dans laquelle toutes les étapes nécessaires aux analyses qualitatives et quantitatives d'un liquide d'intérêt sont intégrées : manipulation de fluide, réactions chimiques et/ou biochimiques, puce de 30 détection optique, électrique et/ou chimique, etc. ; et d'autre part dans l'utilisation de cette carte, ou

laboratoire sur puce, pour effectuer des analyses qualitatives et/ou quantitatives dans des gouttes d'un liquide d'intérêt à analyser (réaction(s) chimique(s)/biochimique(s) et analyse).

5 Dans la présente description, les références entre crochets [ ] renvoient à la liste de références annexée.

#### **Art antérieur**

10 Selon les applications envisagées, cette invention se rapproche du domaine général de la formation de gouttes, du travail en micro-volume(s), des matrices à haute densité de gouttes.

15 La formation de zones localisées pour isoler une phase liquide est répandue dans le domaine des puces biologiques, et notamment des puces à ADN. Pour ces applications, le volume réactionnel est souvent très réduit pour économiser les produits biologiques et les réactifs.

20 Pour la formation de gouttes localisées et de matrices à haute densité de gouttes, les sociétés Protogene Laboratories Inc. [1] et Affymetrix Inc. [2] utilisent une technique utilisant un système de dispense automatisé. Ces systèmes conduisent à la 25 formation de gouttes et de matrices à haute densité de plots ou de gouttes sur une surface.

30 Cependant, outre le système de dispense de gouttes, ces techniques nécessitent toutes l'utilisation d'un dispositif de déplacement et d'alignement précis de ce système, ainsi qu'un dispositif pour l'alimentation en liquide. Le coût de

cet appareillage est élevé. En outre, la densité maximale des matrices de gouttes qui peuvent être formées est limitée par une combinaison entre la taille des gouttes dispensées et le pas minimal inter-plot du 5 système de dispense.

Pour la formation de matrices à haute densité de micro-cuvettes, deux familles de procédés significatifs peuvent être cités : la famille des procédés utilisant la formation d'un réseau de cuvettes 10 micro-fabriquées par gravure dans une plaque de silicium pour réaliser des amplifications d'ADN par PCR en micro-volumes de quelques picolitres, et la famille des procédés utilisant la formation de puits ou de canaux par photolithographie sur des résines 15 photosensibles déposées sur un substrat en plastique [3]. Avec ces techniques, le nombre de puits varie de 100 à 9600 puits, avec des diamètres de 60 à 500  $\mu\text{m}$  et des profondeurs de 5 à 300  $\mu\text{m}$ .

Cependant, les bords de ces cuvettes ne 20 laissent pas de séparation physique entre la phase liquide au sein de la cuvette et celle à l'extérieur de celle-ci, autorisant donc des connexions entre les cuvettes, et donc des contaminations entre elles. En outre, ces dispositifs nécessitent pour leur 25 utilisation des systèmes de dispense de gouttes, un dispositif de déplacement et d'alignement précis de ce système, ainsi qu'un dispositif pour l'alimentation en liquide. On retrouve donc les mêmes inconvénients et problèmes que ceux précités.

30 Pour la détection électrique ou électrochimique dans les tests biologiques, un grand nombre de systèmes

cet appareillage est élevé. En outre, la densité maximale des matrices de gouttes qui peuvent être formées est limitée par une combinaison entre la taille des gouttes dispensées et le pas minimal inter-plot du .5 système de dispense.

Pour la formation de matrices à haute densité de micro-cuvettes, deux familles de procédés significatifs peuvent être cités : la famille des procédés utilisant la formation d'un réseau de cuvettes 10 micro-fabriquées par gravure dans une plaque de silicium pour réaliser des amplifications d'ADN par PCR en micro-volumes de quelques picolitres, et la famille des procédés utilisant la formation de puits ou de canaux par photolithographie sur des résines 15 photosensibles déposées sur un substrat en plastique [3]. Avec ces techniques, le nombre de puits varie de 100 à 9600 puits, avec des diamètres de 60 à 500 µm et des profondeurs de 5 à 300 µm.

Cependant, les bords de ces cuvettes ne 20 laissent pas de séparation physique entre la phase liquide au sein de la cuvette et celle à l'extérieur de celle-ci, autorisant donc des connexions entre les cuvettes, et donc des contaminations entre elles. En outre, ces dispositifs nécessitent pour leur 25 utilisation des systèmes de dispense de gouttes, un dispositif de déplacement et d'alignement précis de ce système, ainsi qu'un dispositif pour l'alimentation en liquide. On retrouve donc les mêmes inconvénients et problèmes que ceux précités.

30 Pour la détection électrique ou électrochimique dans les tests biologiques, un grand nombre de systèmes

de détection électrique ou électrochimique décrits dans la littérature ne permet pas de descendre sous le nanomolaire en termes de limite de détection, limitation souvent due au faible nombre d'électrons 5 générés par chaque hybride.

Les techniques faisant intervenir une accumulation enzymatique permettent d'abaisser cette limite de détection aux environs du picomolaire du fait de l'amplification élevée du nombre d'espèces rédox à 10 détecter présentes dans le milieu réactionnel [4]. Cependant, cette méthode d'amplification engendre un problème pour les systèmes multiplots connus actuellement car le composé rédox diffuse et peut ainsi contaminer les plots voisins.

15 Dans ce but, la plupart du temps, l'utilisation de structures tridimensionnelles (utilisation de compartiments) est recommandée dans la littérature. Par exemple, Infineon [6] propose des murs en polymères et un système de migration des molécules par des forces 20 électriques, de manière à les confiner dans un volume défini et à éviter ainsi la contamination inter-plots. Malheureusement, des problèmes de remplissage fluidique peuvent être rencontrés avec ce genre d'approche lorsqu'on souhaite par exemple travailler en veine 25 liquide très fine. Là aussi, un dispenseur de goutte devient indispensable.

Il existe donc un réel besoin d'un procédé permettant d'obtenir aisément une matrice de gouttes haute densité à partir d'un liquide d'intérêt, 30 utilisable sans aucun appareillage de dispense de gouttes, facile à utiliser, permettant d'éviter

efficacement des contaminations entre les gouttes, et qui peut être utilisé de manière très souple avec tous les procédés actuellement connus de l'homme du métier pour analyser collectivement ou individuellement des 5 micro-volumes, par exemple sur un laboratoire sur puce, qu'il s'agisse d'un procédé chimique, électrique ou optique ou d'une combinaison de ces procédés.

#### Exposé de l'invention

10 La présente invention répond précisément à ce besoin, et à d'autres encore, expliqués ci-dessous, en fournissant un procédé de répartition localisée de gouttes d'un liquide d'intérêt sur une surface active d'un substrat, ledit procédé comprenant les étapes 15 suivantes :

- une introduction du liquide d'intérêt dans une boîte via des moyens d'introduction, ladite boîte enfermant ladite surface active, et

20 - une extraction du liquide d'intérêt de ladite boîte via des moyens d'extraction,

ladite surface active ainsi que les autres surfaces à l'intérieur de la boîte étant sensiblement non mouillantes vis-à-vis du liquide d'intérêt à l'exception de plusieurs zones de capture localisées, 25 formées de manière déterminée sur ladite surface active, qui sont chacune appropriées pour capturer une goutte du liquide d'intérêt,

lesdits moyens d'introduction et d'extraction du liquide d'intérêt dans la boîte étant disposés de 30 telle manière que lorsque le liquide d'intérêt est introduit dans la boîte, il couvre lesdites zones de

capture, et lorsque le liquide d'intérêt est extrait de la boîte, une goutte dudit liquide d'intérêt reste captive de manière répartie et localisée sur chaque zone de capture.

5        Dans le contexte de la présente invention, un liquide est dit « d'intérêt » dès lors que ce liquide est destiné à être capturé par des zones de capture dans un procédé conforme à la présente invention, pour former une matrice de gouttes de ce liquide.

10       Par « liquide d'intérêt », on entend tout liquide susceptible de nécessiter une disposition en matrice de gouttes sur un support, par exemple dans un but analytique et/ou chimique et/ou biochimique. Par « but chimique et/ou biochimique », on entend toute 15 réaction chimique et/ou biochimique qui peut être réalisée dans un liquide. Par « but analytique », on entend toute analyse qualitative et/ou quantitative qui peut être réalisée dans un liquide.

20       Le liquide d'intérêt peut être organique ou aqueux. Il peut s'agir d'un quelconque des liquides actuellement manipulés en laboratoire ou dans l'industrie, par exemple sur des laboratoires sur puce. Il peut s'agir par exemple d'un liquide choisi parmi une solution, un solvant, un réactif, un échantillon, 25 un extrait cellulaire, un prélèvement provenant d'un organisme animal ou végétal, un prélèvement effectué dans la nature ou dans l'industrie, etc. Il peut s'agir d'un liquide biologique ou chimique, par exemple d'une solution dans laquelle une reconnaissance biologique 30 (par exemple protéine/protéine ; hybridation d'acides nucléiques ; antigène/anticorps, etc.) doit être

réalisée et/ou détectée. Ce liquide d'intérêt peut être un liquide dilué, si nécessaire, pour son utilisation avec le dispositif de la présente invention, comme cela peut se faire sur les laboratoires sur puce. Un produit 5 solide peut être mis en solution pour constituer un liquide d'intérêt au sens de la présente invention. Ce produit solide peut être choisi par exemple parmi un produit chimique ou biochimique, un réactif, un matériau à analyser, un prélèvement provenant d'un 10 organisme animal ou végétal, un prélèvement effectué dans la nature ou dans l'industrie, etc. L'homme du métier connaît la manipulation de tels produits et liquides d'intérêt.

De manière générale, le procédé de l'invention 15 peut être utilisé dans un laboratoire sur puce, dans un microsystème pour la chimie ou la biologie, tel qu'un microsystème d'analyse, ou dans une puce biologique (biopuce), par exemple choisie dans le groupe constitué des puces à ADN (acide désoxyribonucléique), à ARN 20 (acide ribonucléique), des puces à protéines, des puces à anticorps, des puces à antigènes, des puces à cellules, etc.

Le procédé de l'invention utilise une boîte. Cette boîte peut être ouverte ou fermée. Elle peut être 25 utilisée uniquement pour obtenir une répartition localisée de gouttes du liquide d'intérêt sur la surface active suivant le procédé de l'invention. Elle peut aussi être utilisée pour confiner les gouttes réparties localement sur la surface active et/ou 30 effectuer des réactions chimiques ou biochimiques et/ou des analyses qualitatives et/ou quantitatives sur ou

dans ces gouttes. La boîte peut donc constituer un véritable laboratoire miniature (laboratoire sur puce).

Les dimensions de cette boîte dépendent notamment des dimensions du substrat comportant la 5 surface active choisie pour la mise en œuvre du procédé de l'invention, mais aussi, le cas échéant, de la présence de dispositifs d'analyse ou microsystèmes additionnels qui peuvent être joints dans ladite boîte, par exemple d'autres laboratoires sur puce, pour la 10 mise en œuvre du procédé de l'invention. Ces dimensions peuvent descendre en dessous du cm pour le côté le plus grand de la boîte.

La boîte peut être constituée par exemple d'un matériau choisi dans le groupe constitué par un 15 polymère organique, une matière plastique élastomère, un verre, du métal, du silicium, une résine photosensible, ou par tout matériau connu de l'homme du métier et permettant la mise en œuvre de la présente invention. Par exemple, il peut s'agir d'un polymère 20 choisi groupe comprenant les polycarbonates, les polydiméthylsiloxanes, les polyméthylmétacrylates, les polychlorobiphényles et les copolymères de cyclooléfines.

Le matériau de la boîte est généralement choisi 25 en fonction du type du liquide d'intérêt à répartir en gouttes, de l'utilisation de la boîte (simplement immersion ou immersion et analyses) et en fonction des spécifications de coût du fabriquant.

Les boîtes utilisables sont de préférence 30 suffisamment étanches pour éviter par exemple les fuites lors de l'immersion dans celles-ci de la surface

active, les contaminations pouvant provenir de l'extérieur de la boîte, par exemple bactérienne, chimiques, etc., et l'évaporation de la, ou des, goutte(s) capturée(s) par la, ou les, zone(s) de 5 capture après l'extraction du liquide d'intérêt de la boîte.

Les boîtes utilisables peuvent comprendre un capot pour leur montage, mais aussi, dans certaines applications, pour leur ouverture ou leur fermeture, 10 notamment afin de pouvoir retirer de celles-ci le substrat avec sa surface active après l'avoir mis en contact avec le liquide d'intérêt et/ou ou après les analyses ou réactions dans les gouttes. La boîte peut alors comprendre des moyens de fixation amovibles du 15 substrat. Si la boîte comprend un capot, il sera de préférence suffisamment étanche pour ne pas perturber l'immersion de la surface active.

Le capot peut être constitué d'un matériau tel que ceux précités pour la boîte. Il peut être fabriqué 20 par exemple par moulage, par emboutissage, par gravure ou par érosion mécanique, etc. Il peut ensuite être fixé définitivement sur la boîte pour la fermer, par exemple par collage, compression, plaquage ou par tout autre moyen connu de l'homme du métier et assurant la 25 tenue et l'étanchéité requise pour l'utilisation de celle-ci. Il peut aussi être fixé sur la boîte de manière amovible, toujours en assurant la tenue et l'étanchéité requise pour l'utilisation de celui-ci, afin que la même boîte ainsi constituée puisse servir à 30 l'immersion successive différents substrats avec

différentes surfaces actives, pour former plusieurs matrices de gouttes.

De préférence, le matériau de la boîte, et, le cas échéant, de son capot, est, à l'intérieur de celle-ci, sensiblement non mouillant vis-à-vis du liquide d'intérêt. En effet, ceci permet d'éviter que des gouttes adhèrent aux surfaces internes de la boîte, après l'extraction du liquide d'intérêt, et tombent sur la surface active et viennent gêner les analyses et réactions sur les gouttes réparties localement sur la surface active. Des traitements de surface peuvent être nécessaires pour obtenir ce résultat, par exemple tels que ceux décrits ci-dessous pour la surface active.

Les boîtes fermées utilisables comprennent des moyens d'introduction et d'extraction du liquide d'intérêt de ladite boîte. Il n'y a pas de limitation dans la position, la forme et la fonction de ces moyens autres que celles-ci : ces moyens doivent permettre l'introduction puis l'extraction du liquide d'intérêt de la boîte ; et ils doivent être disposées de telle manière que lorsque le liquide d'intérêt est introduit dans la boîte, il couvre la ou les zone(s) de capture, et lorsque le liquide d'intérêt est extrait de la boîte, une goutte du liquide d'intérêt reste captive par zone de capture. Ces moyens peuvent comprendre des ouvertures formées sur la boîte. Ces ouvertures peuvent être disposées sur le dessus ou les côtés du capot ou de la boîte, ou encore à travers le substrat. Le liquide d'intérêt peut entrer puis sortir de la boîte par deux ouvertures différentes, une ouverture pour l'introduction du liquide d'intérêt dans la boîte, et

une ouverture pour l'extraction du liquide d'intérêt de la boîte. Le liquide d'intérêt peut aussi entrer puis sortir de la boîte par une seule des deux ouvertures, une deuxième ouverture servant à autoriser l'extraction 5 du liquide d'intérêt, soit en laissant passer l'air appelé par l'extraction, soit en injectant par cette deuxième ouverture un fluide gazeux permettant de pousser le liquide d'intérêt hors de la boîte. Ces ouvertures peuvent être disposées sur le capot ou sur 10 les parois de la boîte, par exemple par gravure, emboutissage, moulage, exposition à la lumière pour une résine photosensible, perçage mécanique, etc.

Les moyens pour introduire le liquide d'intérêt dans la boîte peuvent comprendre en outre tout moyen 15 approprié connu de l'homme du métier pour injecter un liquide dans une boîte, notamment ceux utilisés dans le domaine des laboratoires sur puce et des microsystèmes. Il peut s'agir par exemple d'une seringue, d'une pipette, d'une micropipette, d'une pompe d'injection, 20 etc.

Les moyens d'extraction du liquide d'intérêt de la boîte peuvent être tout moyen approprié connu de l'homme du métier pour extraire un liquide d'une boîte. L'essentiel est que la ou les goutte(s) 25 capturée(s) par la zone de capture ne soient pas entraînées lors de l'extraction du liquide d'intérêt. Par exemple, les moyens d'extraction peuvent comprendre une pompe d'aspiration du liquide d'intérêt hors de la boîte : l'étape d'extraction consiste alors à aspirer 30 le liquide d'intérêt de ladite boîte. Par exemple aussi, les moyens d'extraction peuvent comprendre une

pompe d'injection d'un fluide gazeux dans la boîte : l'étape d'extraction consiste alors à injecter un fluide gazeux dans la boîte de manière à expulser le liquide d'intérêt de ladite boîte. Avantageusement, le 5 fluide gazeux injecté peut être saturé en vapeur du liquide d'intérêt par toute technique connue de l'homme du métier. En outre, de manière générale, les ouvertures ou connexions de la boîte vers l'extérieur peuvent avantageusement être reliées à des réserves de 10 gaz saturé en vapeur de la phase liquide d'intérêt, ce qui a pour avantage d'éviter l'évaporation des gouttes une fois formées, en particulier lorsque les dimensions de la boîte et du substrat utilisés sont très faibles. Le gaz ou fluide gazeux peut être de l'air, ou un gaz 15 neutre si nécessaire.

Le substrat peut être constitué de tout matériau approprié pour mettre en œuvre la présente invention. Il peut s'agir par exemple d'un des matériaux de base utilisés pour fabriquer les 20 laboratoires sur puce, des puces biologiques, microsystèmes, etc. Il peut s'agir par exemple d'un matériau choisi dans le groupe constitué de silicium, d'oxyde de silicium, de nitrure de silicium, de verre, d'un polymère organique, et d'un métal ou d'un alliage 25 de métal. Les polymères organiques peuvent être par exemple choisis dans le groupe comprenant les polycarbonates, les polydiméthylsiloxanes, les polyméthylmétacrylates, les polychlorobiphényles et les copolymères de cyclooléfines. Le métal peut être choisi 30 par exemple dans le groupe constitué par Au, Ti, Pt,

Al, Ni, et l'alliage de métal peut être de l'acier inox.

Le substrat peut constituer une des parois de la boîte. Les parois constituant la boîte peuvent alors 5 être montées à partir du substrat, par exemple par collage ou compression, pourvu que la surface active soit dans la boîte.

La surface active peut être constituée de tout matériau sensiblement non mouillant vis-à-vis de le 10 liquide d'intérêt et approprié pour mettre en œuvre la présente invention. En effet, le fonctionnement du procédé de la présente invention repose en partie sur le fait que la surface active ne retient pas ou très peu le liquide d'intérêt, ce qui permet un dé-mouillage 15 total, facile, sans rétention de liquide d'intérêt sur la surface, et ceci sans séchage. Ainsi, les gouttes de liquide d'intérêt sont capturées sélectivement et exclusivement par la, ou les, zone(s) de capture, et sont circonscrites à ces zones, ce qui évite tout 20 problème de contamination entre les gouttes capturées.

Le matériau de la surface active est donc notamment choisi en fonction du liquide d'intérêt à partir duquel une matrice de gouttes doit être formée, mais aussi en fonction du substrat, des zones de 25 capture, et le cas échéant, en fonction de zones de travail arrangées avec ces zones de capture (les zones de travail sont définies ci-dessous). Il peut être disposé sur le substrat par modification chimique ou par dépôt. Il peut s'agir également du substrat lui-même s'il est constitué d'un matériau sensiblement non mouillant vis-à-vis du liquide d'intérêt.

Par exemple, lorsque le liquide d'intérêt est aqueux, le matériau formant la surface active est avantageusement hydrophobe. Par exemple, dans les exemples de matériaux précités constituant le substrat, 5 la surface du substrat peut être rendue non mouillante, ici hydrophobe, par modification chimique, par exemple par silanisation avec un silane porteur de fonctions hydrophobes, par exemple 1H, 1H, 2H, 2H-perfluorodécyl-trichlorosilane. Il peut s'agir par exemple aussi d'un 10 dépôt de téflon liquide sur plateau tournant ; d'une silanisation en phase gazeuse de silane hydrophobe ; de l'utilisation de silane hydrocarboné, par exemple du type octadécyltrichlorosilane. Les matériaux et procédés utilisables pour la mise en œuvre de telles 15 modifications chimiques sont connus de l'homme du métier. Un exemple de réalisation est donné ci-dessous.

Le traitement permettant de rendre la surface du substrat non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt peut être réalisé, avant ou après la 20 formation de la, ou des, zone(s) de capture et/ou de la, ou des, zone(s) de travail correspondantes. Ces dernières seront éventuellement protégées au cas où il est réalisé après celles-ci.

La forme et la taille de cette surface active, 25 et donc aussi du substrat sur lequel elle est formée, n'ont pas d'importance pour le fonctionnement du procédé de l'invention. Elles sont généralement déterminées en fonction du nombre de zones de gouttes de liquide d'intérêt à former sur cette surface et des 30 spécifications de coût. Toutefois, afin d'éviter des rétentions non prévues de liquide d'intérêt sur la

surface, de préférence, elle est choisie plane. Par exemple, la surface active peut avoir une forme et une taille comparables aux plaquettes utilisées pour la fabrication de laboratoires sur puce et des 5 microsystèmes d'analyse et de détection connus de l'homme du métier.

La surface du substrat utilisée dans le procédé de l'invention (surface active) est modifiée (structuration) afin de créer des zones localisées 10 mouillantes vis-à-vis du liquide d'intérêt, c'est à dire de forte affinité pour le liquide d'intérêt, ou au niveau desquelles le liquide peut être retenu par des forces capillaires. Ces zones sont appelées « zones de capture ». Le terme « localisé » est défini ci-dessus. 15 En faisant ruisseler un peu de liquide d'intérêt sur la surface active, les zones de capture capturent, ou retiennent, une goutte de liquide d'intérêt, alors que la surface active, sensiblement non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt, ne retient pas ou très peu de 20 liquide d'intérêt. En cessant le ruissellement, seules les gouttes de liquide d'intérêt retenues localement par les zones de capture restent sur la surface active.

Une multitude de solutions peuvent être envisagées pour former ces zones de capture sur la 25 surface active du substrat : traitement chimique de surface pour augmenter localement l'affinité avec le liquide, par exemple par greffage de molécules avec groupements spécifiques, électro-mouillage localisé grâce à des micro-électrodes, micro-cuvettes formées 30 par des couronnes en relief sur la surface, micro-cuvettes gravées en profondeur, etc. En effet, la, au

moins une, zone de capture peut être une zone de capture chimique, électrique ou physique d'une goutte de liquide d'intérêt. Il peut s'agir de tout type de zone, localisée, qui permet de capturer une goutte de 5 liquide d'intérêt par simple contact de cette zone avec le liquide d'intérêt.

A titre d'exemple, il peut s'agir d'une zone de capture par mouillage. En effet, la zone de capture peut être constituée d'un matériau support qui est 10 disposé de manière déterminée sur ladite surface active ou sur le substrat et qui, si nécessaire, peut être modifié chimiquement pour le rendre mouillant vis-à-vis du liquide d'intérêt, par exemple par greffage sur celui-ci d'une fonction chimique mouillante vis-à-vis 15 dudit liquide d'intérêt.

Par exemple, ce matériau support peut être constitué d'un matériau choisi dans le groupe constitué du silicium, de l'oxyde de silicium ( $SiO_2$ ) ; du verre ; du nitrure de silicium ( $Si_3N_4$ ) ; des polymères, par 20 exemple des polymères organiques tels que ceux choisis dans le groupe comprenant les polycarbonates, les polydiméthylsiloxanes, les polyméthylmétacrylates, les polychlorobiphényles et les copolymères de cyclooléfines ; et d'un métal ou d'un métal ou d'un 25 alliage métallique, par exemple choisi parmi Al, Au, ou l'acier inox.

Par exemple, la fonction chimique mouillante vis-à-vis d'un liquide d'intérêt aqueux peut être choisie dans le groupe constitué d'une fonction alcool, 30 alcoolate, acide carboxylique, carboxylate, acide

sulfonique, sulfonate, oxyamine, hydrazine, amine et ammonium.

Par exemple, le procédé décrit dans le document [9] ou [10] peut être utilisé pour fabriquer ce type de 5 zone de capture.

A titre d'exemple aussi, en particulier lorsque le procédé de l'invention est destiné à répartir des gouttes du liquide d'intérêt aqueux, et lorsque la surface active ou le substrat est à base de silicium, 10 la zone de capture peut être constituée de silicium noir hydrophile, qui peut être formé très facilement sur une telle surface par gravure. La zone gravée devient particulièrement mouillante vis-à-vis d'un liquide d'intérêt aqueux. La zone gravée ne nécessite 15 pas d'autre modification chimique pour être mouillante vis-à-vis des solutions aqueuses. Cet exemple de réalisation est donc très économique. Par exemple le document [11] expose un protocole de laboratoire pouvant être utilisé pour fabriquer ce type de zones de 20 capture.

A titre d'exemple aussi, la zone de capture peut être une électrode de capture par mouillage. Suivant cet exemple, la zone de capture, ici une électrode, peut être constituée par exemple d'un 25 matériau choisi dans le groupe constitué des métaux nobles, par exemple Au, Pt, Pd, Ti, Ni, Al, etc., ou un alliage de métaux nobles ; de carbone ; de graphite ; et d'oxyde d'indium et d'étain (ITO) ; ledit matériau étant rendu mouillant par électrodéposition sur celui-ci d'un polymère conducteur d'électricité sur lequel 30 est fixée une fonction chimique mouillante vis-à-vis du

liquide d'intérêt. Le polymère conducteur d'électricité peut être un des polymères utilisés dans la fabrication des laboratoires sur puce. Il peut être choisi par exemple dans le groupe constitué du polypyrrole, de la 5 polyaniline, du polyazulène, d'un polythiophène, du polyindole, du polyfurane, du polyfluorène La fonction chimique mouillante peut être par exemple une des fonctions chimiques mouillantes citées ci-dessus. Sa fixation sur le monomère avant polymérisation ou sur le 10 polymère une fois qu'il est formé peut être effectuée par les techniques classiques de chimie. Un exemple de procédé de fabrication de ce type de zone de capture utilisable pour mettre en œuvre le procédé de la 15 présente invention peut être trouvé dans le document [4].

A titre d'exemple aussi, la zone de capture peut être une zone de capture d'une goutte du liquide d'intérêt par des forces capillaires. Il peut s'agir par exemple d'une gravure de, ou une saillie sur, la 20 surface active permettant de capturer la goutte par des forces capillaires. Ces gravures ou saillies peuvent être réalisées par exemple par gravure directe du substrat ; par dépôt d'un matériau à la surface d'un substrat plan, par exemple par couchage, évaporation, 25 pulvérisation, ou dépôt électrochimique, puis gravure en conjonction avec un procédé classique de photolithographie, par exemple par couchage de résine, insolation et définition de motifs, ou gravure ; par définition directe de motifs par photolithographie dans 30 des polymères photosensibles, par exemple dans le cas de résines photosensibles ; moulage ou emboutissage de

matériaux plastiques. Ces procédés sont connus de l'homme du métier. L'essentiel est que ces gravures ou saillies qui forment ces zones de capture permettent de capturer, de manière localisée, par capillarité, une 5 goutte du liquide d'intérêt.

A titre d'exemple encore, les zones de capture peuvent être en cuvette sur le substrat, ou en saillies, construites de manière à former des bordures sur ladite surface active. De préférence les bordures 10 ne se touchent pas entre elles, elles n'ont pas de bord commun, et elles forment chacune une cuvette sur la surface du substrat destinée capturer une goutte du liquide d'intérêt. La figure 11 annexée est une 15 représentation schématique en coupe de deux types de cuvettes utilisables dans le procédé de l'invention : à gauche des cuvettes ( $c_s$ ) « enfoncées » dans un substrat ( $S_a$ ), et à droite des cuvettes (c) formées grâce à leur bordure (b) sur un substrat (S). A droite, un espace libre reste disponible entre les cuvettes (c) pour 20 l'écoulement du liquide d'intérêt. La fabrication des bordures ou cuvettes peut être réalisée par exemple par gravure directe du substrat ; dépôt d'un matériau à la surface d'un substrat plan, par exemple par couchage, évaporation, pulvérisation, ou dépôt électrochimique, 25 puis gravure en conjonction avec un procédé classique de photolithographie, par exemple par couchage de résine, insoluation et définition de motifs, ou gravure ; définition directe de motifs par photolithographie dans des polymères photosensibles, 30 par exemple dans le cas de résines photosensibles ; moulage ou emboutissage, par exemple de matériaux

plastiques ou du substrat formant la surface active. Ces procédés sont connus de l'homme du métier. Elles peuvent en particulier être formées durant la dernière étape d'un empilement technologique de plusieurs couches sur le substrat. Les couches inférieures pourront contenir des actionneurs ou des détecteurs mécaniques, optiques ou électroniques, par exemple de type MEMS ou MEMS optique ("Micro Electro Mechanical System") ou encore des molécules greffées d'intérêt chimique ou biologique destinés à former une zone de travail.

Lorsque le liquide d'intérêt est aqueux, la zone de capture est de toute préférence une zone hydrophile et la surface active sensiblement non mouillante est de toute préférence hydrophobe. Ainsi, la zone de capture peut capturer la goutte du liquide d'intérêt par des interactions de type hydrophile/hydrophobe avec le liquide d'intérêt. De manière générale, la zone de capture capture localement la goutte de liquide d'intérêt du fait d'une mouillabilité (chimique ou capillarité) de la zone de capture pour le liquide d'intérêt plus importante que celle de la surface active.

Selon l'invention, les zones de capture localisées, réparties de manière déterminée sur ladite surface active, peuvent former une matrice. Par matrice de gouttes, on entend un arrangement déterminé desdites gouttes, sans qu'une forme géométrique particulière dudit arrangement soit exigée. La matrice de gouttes peut être ronde, carrée, polygonale et même aléatoire, l'essentiel étant que les gouttes formées soient

disposées de manière localisée et déterminée sur la surface conformément à l'objectif atteint par la présente invention. Par localisée, on entend circonscrite, individualisée et distincte des autres 5 gouttes capturées volontairement sur la surface active grâce au procédé de l'invention.

Selon l'invention, la zone de capture peut avoir n'importe quelle forme, pourvu qu'elle capture une goutte du liquide d'intérêt. Cette zone peut être 10 choisie, à titre d'exemple, parmi une forme annulaire, en étoile, en rectangle, en carré, en triangle, en ellipse, ou en polygone ayant de 4 à 20 côtés, ou toute autre forme convenant à la mise en œuvre de la présente invention. En général, elle est sous forme de bande.

15 En outre, chaque zone de capture peut être arrangée avec au moins une zone de travail (définie ci-dessous) formée sur ladite surface active de telle manière que cette zone de travail soit en contact avec la goutte du liquide d'intérêt lorsqu'elle est capturée 20 par ladite zone de capture. De préférence, au moins une zone de capture a une forme annulaire, ouverte ou fermée, qui entoure la, au moins une, zone de travail arrangée avec elle. Par ailleurs, une zone de capture d'une goutte de liquide d'intérêt peut entourer 25 plusieurs zones de travail, par exemple de 2 à 4 ou plus, pourvu que, lorsqu'une goutte du liquide d'intérêt est capturée par la zone de capture, cette goutte recouvre, au moins partiellement, toutes les zones de travail qui sont entourées par cette zone de 30 capture.

Par zone de travail, on entend une zone au niveau de laquelle des opérations physiques et/ou chimiques et/ou optiques peuvent être menées dans la goutte capturée par la zone de capture avec laquelle 5 elle est arrangée. Ainsi, selon l'invention, la, au moins une, zone de travail peut être une zone d'interaction choisie parmi une zone d'interaction électrique, chimique, mécanique, optique avec ladite goutte de liquide d'intérêt capturée, ou une zone au 10 niveau de laquelle plusieurs de ces interactions sont utilisées simultanément ou successivement.

A titre d'exemple, la zone de travail peut être une zone d'interaction chimique avec la goutte de liquide d'intérêt capturée, avec ou sans microcellule 15 électrochimique. La zone de travail peut par exemple comporter des fonctions ou des réactifs chimiques ou biologiques prêts à réagir avec une cible de ces fonctions ou de ces réactifs présente dans un liquide 20 d'intérêt. Cette zone de travail peut être choisie parmi celles connues de l'homme du métier dans le domaine des puces biologiques (puces commercialisées 25 par AGILENT, CIPHERGEN, EUROGENTEC). La différence du dispositif de la présente invention avec ces puces de l'art antérieur réside surtout en la présence de la zone de capture d'une goutte de liquide d'intérêt arrangée avec ladite zone de travail. Cette zone de travail peut être fabriquée par exemple par silanisation puis immobilisation de la sonde biologique 30 comme cela est décrit par exemple dans le document [12].

Cette zone de travail peut être par exemple une zone fonctionnalisée par une molécule chimique

(« sonde ») destinée à interagir avec une cible susceptible d'être présente dans un liquide d'intérêt. La molécule chimique (« sonde ») peut être choisie par exemple dans le groupe constitué par les molécules 5 porteuses de fonction silanol, les complexes organométalliques (par exemple du rhodium lié à des phosphines chirales telles que le BINAP (marque de commerce), la DUPHOS (marque de commerce) intervenant dans des réactions d'hydrogénéation, ou bien des 10 complexes du ruthénium intervenant par exemple dans des synthèses de cétones insaturées) et les catalyseurs à base de métaux (par exemple palladium supporté sur silice, chlorure d'aluminium). La « cible » correspondante à chacune de ces fonctions chimiques 15 (« sondes ») peut être par exemple choisie dans le groupe constitué des silanes (par exemple tri-, di-, mono-éthoxysilane ou tri-, di-, mono-chlorosilane), des composés alcéniques (par exemple les déhydroaminoacides), des dérivés alcools allyliques 20 (par exemple le 3-buten-2-ol), des composés aromatiques chlorés (par exemple mono-, di-, tri-chlorophénol), des mélanges de composés aromatiques et de réactifs halogénés (par exemple benzène et brome, ou benzène et chlorure d'acétyle).

25 La zone de travail peut comporter par exemple un polymère fonctionnalisé par une sonde biologique telles que celles citées ci-dessus, dans le but de fixer une cible correspondante susceptible d'être présente dans un liquide d'intérêt pour la détecter, 30 par exemple optiquement. Par exemple, sur un substrat tels que ceux précités, cette zone de travail peut être

obtenue selon les méthodes décrites dans le document [13].

A titre d'exemple également, selon l'invention, la zone de travail peut être une zone d'interaction électrique, par exemple une microcellule électrochimique. Une microcellule électrochimique est un dispositif possédant au moins deux électrodes, préférentiellement coplanaires, formant une électrode de travail et une contre-électrode. Elle peut également posséder une électrode de référence. Ces éléments sont connus de l'homme du métier et les procédés de fabrication connus de l'homme du métier sont utilisables pour fabriquer cette zone de travail, par exemple le procédé décrit dans le document référencé [8]. La zone de travail constitue alors un véritable microréacteur électrochimique qui utilise les gouttes de liquide d'intérêt capturées par les bordures comme milieux réactionnels, et plus précisément comme milieux électrochimiques. Chaque réacteur électrochimique (bordure + zone de travail sous forme de microcellule électrochimique + goutte de liquide d'intérêt capturée) suivant cette première forme de réalisation de la présente invention peut être utilisé pour réaliser toute réaction et/ou analyse électrochimique connue de l'homme du métier.

Le procédé de l'invention utilisant ces réacteurs électrochimiques peut servir par exemple à effectuer des réactions d'électropolymérisation localisée d'un ou de plusieurs monomère(s) présent(s) dans la goutte (polymérisation ou copolymérisation) et/ou d'électro-greffage localisé d'une ou de plusieurs

molécule(s) chimique(s) présente(s) dans la goutte du liquide d'intérêt sur une des électrodes de la microcellule. Dans cet exemple, le liquide d'intérêt peut être un liquide contenant les réactifs nécessaires 5 à l'électropolymérisation ou à l'électrogreffage désiré. La polymérisation et le greffage sont alors avantageusement localisés au niveau de chaque goutte du liquide d'intérêt capturée par chaque zone de capture. De telles réactions d'électropolymérisation ou greffage 10 localisés peuvent être utilisées par exemple pour la fabrication de puces biologiques ou systèmes d'analyse.

Dans un exemple particulier de mise en œuvre du procédé de l'invention, la microcellule électrochimique peut être utilisée d'abord pour « fabriquer » les zones 15 de travail, et ensuite, par exemple, pour utiliser ces zones de travail pour l'analyse des gouttes d'un liquide d'intérêt à analyser. Par exemple, si les zones de travail doivent comprendre un polymère organique fonctionnalisé par une sonde, par exemple une sonde 20 biologique, elles peuvent être fabriquées par électropolymérisation d'un polymère conducteur fonctionnalisé par une sonde, par exemple suivant le procédé décrit dans le document référencé [5]. La particularité liée à l'utilisation du procédé de 25 l'invention est qu'on utilise les zones de capture pour capturer de manière localisée sur chaque zone de travail une première goutte d'un premier liquide d'intérêt contenant les réactifs nécessaires à l'électropolymérisation (monomère organique). La 30 fonctionnalisation par la sonde, peut être réalisée simultanément à l'électropolymérisation, le premier

liquide d'intérêt contient alors aussi la sonde (par exemple monomère fonctionnalisé par la sonde). La fonctionnalisation peut aussi être réalisée postérieurement à l'électropolymérisation au moyen d'une deuxième goutte d'un deuxième liquide d'intérêt (contenant la sonde) capturée par les mêmes zones de capture et, de ce fait localisée sur les mêmes zones de travail. En outre, les zones de travail ainsi fabriquées peuvent ensuite être séchées, et elles peuvent servir, toujours grâce à leur zone de capture qui les entoure, à capturer une goutte d'un troisième liquide d'intérêt à analyser, contenant une cible qui interagit avec la sonde (par exemple oligonucléotides complémentaires). Un quatrième liquide d'intérêt peut encore être utilisé pour analyser (détection et/ou dosage) l'interaction sonde/cible sur lesdites zones de travail, et ainsi de suite.

Le microréacteur électrochimique qui peut être utilisé dans le procédé de l'invention peut servir par exemple aussi à effectuer des analyses électrochimiques, qualitatives et/ou quantitatives, d'analytes présents dans les gouttes capturées par les zones de capture. Il peut servir par exemple aussi à effectuer des analyses électrochimiques, qualitatives et/ou quantitatives, d'une interaction moléculaire sonde/cible, la sonde étant fixée sur les zones de travail, et la cible se trouvant dans les gouttes du liquide d'intérêt capturées.

Dans un exemple particulier, où la microcellule électrochimique est utilisée pour détecter une cible présente dans un échantillon liquide, par exemple en

mettant en jeu une interaction de la cible à détecter avec une sonde spécifique fixée sur les zones de travail, il est possible de détecter électrochimiquement ladite interaction par exemple avec 5 amplification du signal par accumulation enzymatique dans une goutte d'un liquide d'intérêt, contenant un substrat enzymatique, capturée par la zone de capture qui entoure chaque zone de travail. Le document [4] expose un protocole opératoire utilisable pour ce type 10 de détection, avec le procédé de la présente invention.

La détection d'une interaction sonde/cible sur une zone de travail peut faire intervenir un des autres moyens connus de l'homme du métier que la cellule électrochimique, par exemple un de ceux exposés dans la 15 présente description, par exemple un procédé optique. La microcellule électrochimique peut donc servir dans ce cas uniquement à « fabriquer » les zones de travail, la détection d'une interaction sonde/cible étant ensuite effectuée par un autre moyen, ou alors à 20 analyser une interaction sonde/cible, la fabrication des zones de travail étant réalisée par un autre procédé, par exemple un de ceux connus de l'homme du métier dans le domaine des puces biologiques.

De manière générale, selon l'invention, 25 lorsqu'une sonde est utilisée sur les zones de travail, elle peut être choisie par exemple dans le groupe constitué par une enzyme, un substrat d'enzyme, un oligonucléotide, un oligonucléoside, une protéine, un récepteur membranaire d'une cellule eucaryote ou 30 procaryote, un anticorps, un antigène, une hormone, un métabolite d'un organisme vivant, une toxine d'un

organisme vivant, polynucléotide, polynucléoside, ADN complémentaire, ou un mélange de celles-ci. Elle est bien entendu choisie en fonction de la cible avec laquelle elle devra interagir.

5 A titre d'exemple également, la zone de travail peut posséder des dispositifs actifs ou de mesure, tels que des capteurs ou des actionneurs. Ces dispositifs peuvent s'ajouter aux zones de travail précitées, ou être exclusifs suivant l'objectif visé dans la mise en  
10 œuvre de la présente invention. Les dispositifs actifs ou de mesure sont avantageusement situés au centre des zones de capture. Lorsque la zone de travail comprend un capteur, il peut être choisi par exemple dans le groupe constitué des capteurs électriques, magnétiques,  
15 électrostatiques, mécaniques (par exemple capteur de pression), thermiques (par exemple capteurs de température), optiques (par exemple dispositif de détection optique) et chimiques. Lorsque la zone de travail comprend un actionneur, il peut être choisi par  
20 exemple dans le groupe constitué des actionneurs optiques (source lumineuse), électriques, magnétiques, électrostatiques, mécaniques (déplacement mécanique), thermique (résistance chauffante) et chimiques. De tels capteurs et actionneurs, utilisables pour la mise en  
25 œuvre de la présente invention, ainsi que leur procédé de fabrication sont connus de l'homme du métier, notamment dans le domaine des laboratoires sur puce.

30 Pour la mise en œuvre du procédé de l'invention, la, au moins une, zone de travail peut être une zone sensiblement non mouillante ou mouillante

vis-à-vis du liquide d'intérêt. Les inventeurs ont en effet noté au cours de leurs expérimentations que la mouillabilité de la zone de travail n'est pas déterminante pour le fonctionnement du procédé de la 5 présente invention. Ils ont en effet remarqué, de manière tout à fait inattendue, que le procédé de la présente invention peut aussi fonctionner lorsque la zone de travail est non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt, pourvu que la goutte capturée recouvre au 10 moins partiellement ladite zone de travail.

Les dimensions d'une zone de capture peuvent varier largement en fonction de l'utilisation à laquelle elle est destinée et de sa nature (type de 15 zone de capture, une ou plusieurs zones de travail par zone de capture, un ou plusieurs zone(s) de travail sur la surface active, etc.). Par exemple pour un laboratoire sur puce ou un microsystème, la zone de capture peut avoir un diamètre allant de 5  $\delta$ m à 5 mm. 20 Lorsque la zone de capture est sous forme de bande, cette bande peut avoir une largeur de 1 à 500  $\delta$ m et une épaisseur par rapport à la surface active de 0 à 500  $\delta$ m. La zone de travail, dont la dimension dépend notamment de la zone de capture (la goutte capturée 25 devant recouvrir au moins partiellement cette zone de travail) peut avoir par exemple, avec les dimensions précitées de la zone de capture, un diamètre tel qu'il touche la zone de capture qui l'entoure ou non. Par exemple, la zone de travail peut avoir un diamètre de 30 5  $\delta$ m à 5 mm.

vis-à-vis du liquide d'intérêt. Les inventeurs ont en effet noté au cours de leurs expérimentations que la mouillabilité de la zone de travail n'est pas déterminante pour le fonctionnement du procédé de la 5 présente invention. Ils ont en effet remarqué, de manière tout à fait inattendue, que le procédé de la présente invention peut aussi fonctionner lorsque la zone de travail est non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt, pourvu que la goutte capturée recouvre au 10 moins partiellement ladite zone de travail.

Les dimensions d'une zone de capture peuvent varier largement en fonction de l'utilisation à laquelle elle est destinée et de sa nature (type de 15 zone de capture, une ou plusieurs zones de travail par zone de capture, un ou plusieurs zone(s) de travail sur la surface active, etc.). Par exemple pour un laboratoire sur puce ou un microsystème, la zone de capture peut avoir un diamètre allant de 5  $\mu\text{m}$  à 5 mm. 20 Lorsque la zone de capture est sous forme de bande, cette bande peut avoir une largeur de 1 à 500  $\mu\text{m}$  et une épaisseur par rapport à la surface active de 0 à 500  $\mu\text{m}$ . La zone de travail, dont la dimension dépend notamment de la zone de capture (la goutte capturée 25 devant recouvrir au moins partiellement cette zone de travail) peut avoir par exemple, avec les dimensions précitées de la zone de capture, un diamètre tel qu'il touche la zone de capture qui l'entoure ou non. Par exemple, la zone de travail peut avoir un diamètre de 30 5  $\mu\text{m}$  à 5 mm.

Selon l'invention, la surface active peut aussi être définie de la manière suivante lorsque la zone de capture est sous la forme d'une bordure (voir figure 11 à titre indicatif pour les références) :

5            D : diamètre intérieur des gouttes, avec, par exemple,  $15\delta_m \leq D \leq 5mm$  ;  
          L : espace entre gouttes ;  
          e : section du muret la plus large, avec, par exemple,  $20\delta_m \leq e \leq 100\delta_m$  ; et  
10          h : hauteur du muret, avec, par exemple,  $5\delta_m \leq h \leq 20\delta_m$  ;  
          avec  $h/D < 0,15$  ;  $e/D < 0,33$  ; et  $h/L < 0,3$ .

Ainsi, à titre d'exemple, les bordures se présentent avantageusement sous la forme d'anneau, éventuellement avec une des formes géométriques précitées, dont la hauteur (h) à partir de la surface active est de 5 à 20  $\mu m$  ; dont la section (e) de l'anneau au niveau de la surface active est de 20 à 100  $\mu m$  ; et dont le diamètre (D) à l'intérieur de la bordure, délimitant la zone de travail, est de 15  $\delta_m$  à 5 mm.

Dans le domaines des laboratoires sur puces et des microtechnologies, où la dimension caractéristique des zones de capture est proche de 100  $\delta_m$ , l'orientation de la boîte n'a pas d'importance car les forces de gravité deviennent négligeables devant les forces de capture de la goutte par les zones de capture issues d'interactions à courte distance. En revanche, pour des applications visant des échelles de taille plus élevées pour la mise en œuvre de la présente

Selon l'invention, la surface active peut aussi être définie de la manière suivante lorsque la zone de capture est sous la forme d'une bordure (voir figure 11 à titre indicatif pour les références) :

5           D : diamètre intérieur des gouttes, avec, par exemple,  $15\mu\text{m} \leq D \leq 5\text{mm}$  ;

          L : espace entre gouttes ;

          e : section du muret la plus large, avec, par exemple,  $20\mu\text{m} \leq e \leq 100\mu\text{m}$  ; et

10          h : hauteur du muret, avec, par exemple,  $5\mu\text{m} \leq h \leq 20\mu\text{m}$  ;  
              avec  $h/D < 0,15$  ;  $e/D < 0,33$  ; et  $h/L < 0,3$ .

Ainsi, à titre d'exemple, les bordures se présentent avantageusement sous la forme d'anneau, 15 éventuellement avec une des formes géométriques précitées, dont la hauteur (h) à partir de la surface active est de 5 à 20  $\mu\text{m}$  ; dont la section (e) de l'anneau au niveau de la surface active est de 20 à 100  $\mu\text{m}$  ; et dont le diamètre (D) à l'intérieur de la 20 bordure, délimitant la zone de travail, est de 15  $\mu\text{m}$  à 5 mm.

Dans le domaines des laboratoires sur puces et des microtechnologies, où la dimension caractéristique 25 des zones de capture est proche de 100  $\mu\text{m}$ , l'orientation de la boîte n'a pas d'importance car les forces de gravité deviennent négligeables devant les forces de capture de la goutte par les zones de capture issues d'interactions à courte distance. En revanche, 30 pour des applications visant des échelles de taille plus élevées pour la mise en œuvre de la présente

invention, la boîte utilisée est bien entendu préférentiellement placée horizontalement avec une structuration de la surface active pour former les zones de capture et de travail vers le haut.

5 Le procédé de la présente invention peut être schématisé en deux étapes de la manière suivante :

- remplissage total ou partiel de la boîte, ou chambre fluidique, par le liquide d'intérêt de manière à couvrir la ou les zone(s) de capture, puis

10 - extraction du liquide de la boîte.

Seule(s) la ou les zones de capture retiennent chacune une goutte du liquide d'intérêt, la surface active étant non mouillante.

La mise en oeuvre du procédé de la présente 15 invention dans ses différentes applications peut donc faire intervenir successivement une opération qui se déroule collectivement, puis des opérations individuelles au niveau de chacune des gouttes formées.

Ainsi, dans une première opération, dite collective, le 20 procédé de l'invention permet le passage d'une veine fluidique du liquide d'intérêt, par exemple injectée dans ladite boîte, à une matrice de gouttes, ou micro-volumes, indépendantes les unes des autres. Ensuite, des procédés de détection et/ou de réactions chimiques 25 ou biochimiques connues de l'homme du métier peuvent être mis en oeuvre individuellement (opération individuelle), en parallèle ou successivement, dans chacune des gouttes capturées par les zones de capture pour détecter et analyser des cibles présentes dans le 30 liquide d'intérêt.

Ainsi, la présente invention se rapporte également à l'utilisation du procédé de l'invention dans des laboratoires sur puce et microsystèmes pour la chimie ou la biologie, par exemple pour l'analyse et/ou 5 la détection d'analytes cibles présents dans un liquide d'intérêt à analyser. Les laboratoires sur puce et microsystèmes pouvant eux-mêmes être obtenus en mettant en oeuvre le procédé de l'invention, comme cela apparaît à l'homme du métier à la lecture de la 10 présente description.

La présente invention se rapporte également à un procédé de détection d'au moins une molécule susceptible d'être présente dans un liquide d'intérêt, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

15 - répartition localisée de gouttes de liquide d'intérêt sur une surface active dans une boîte suivant le procédé de la présente invention, et

20 - détection électrochimique dans lesdites gouttes, de la, au moins une, molécule susceptible d'être présente.

La boîte utilisée dans ce procédé comprend un substrat, une surface active, des zones de captures arrangées avec des zones de travail qui sont des microcellules électrochimiques. Le substrat, la 25 structuration pour former la zone de travail, le traitement de la surface du substrat destiné à la rendre sensiblement non mouillante, et la structuration de la surface destinée à former la zone de capture d'une goutte du liquide d'intérêt sont définis ci- 30 dessus.

La présente invention se rapporte également à un procédé de détection optique d'au moins une molécule susceptible d'être présente dans un liquide d'intérêt, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

5           - une répartition localisée de gouttes du liquide d'intérêt sur une surface active dans une boîte suivant le procédé la présente invention, et

          - détection dans ladite boîte, dans au moins une desdites gouttes, de la, au moins une, molécule

10          susceptible d'être présente au moyen d'un détecteur optique.

La boîte utilisée dans ce procédé comprend un substrat, une surface active, des zones de captures arrangeées avec des zones de travail, ces dernières 15 étant des détecteurs optiques. Le substrat, la structuration pour former la zone de travail, le détecteur optique, le traitement de la surface du substrat destiné à la rendre sensiblement non mouillante, et la structuration de la surface destinée 20 à former la zone de capture d'une goutte du liquide d'intérêt sont définis ci-dessus.

La détection optique peut être réalisée après une mise en œuvre d'une réaction électrochimique dans les gouttes capturées (dans le cas où les zones de travail comprennent, en plus du détecteur optique, une cellule électrochimique), ou chimique ou biochimique dans la goutte capturée (par exemple une réaction enzymatique mettant en évidence une interaction sonde/cible sur la zone de travail recouverte par la 30 goutte du liquide d'intérêt).

Selon l'invention, des détections de différentes molécules susceptibles d'être présentes dans le liquide d'intérêt peuvent être réalisées en parallèle, simultanément ou successivement, dans 5 différentes gouttes de liquide d'intérêt captives sur ladite surface active dans la boîte.

Selon l'invention, le, au moins un, analyte à déetecter peut être choisi par exemple parmi les molécules biologique ou chimique. Les molécules 10 biologiques peuvent être choisies par exemple dans le groupe constitué par une enzyme, un substrat d'enzyme, un oligonucléotide, un oligonucléoside, une protéine, un récepteur membranaire d'une cellule eucaryote ou procaryote, un virus, un anticorps, un antigène, une 15 hormone, un métabolite d'un organisme vivant, une toxine d'un organisme vivant, un nucléotide, un nucléoside, un ADN complémentaire. La molécule chimique peut être toute molécule qui doit être analysée qualitativement et/ou quantitativement.

20 Selon l'invention, des détections de différents analytes susceptibles d'être présents dans le liquide d'intérêt peuvent être réalisées en parallèle, simultanément ou successivement, dans différentes gouttes de liquide d'intérêt captives sur ladite 25 surface active dans la boîte.

La présente invention se rapporte également à un procédé d'électropolymérisation de molécules présentes dans un liquide d'intérêt, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- répartition localisée de gouttes du liquide d'intérêt sur une surface active dans une boîte suivant le procédé de l'invention, et
- électropolymérisation dans ladite boîte,  
5 dans les gouttes dudit liquide d'intérêt, des molécules à polymériser.

La boîte utilisée dans ce procédé comprend un substrat, une surface active, des zones de captures arrangeées avec des zones de travail, ces dernières 10 étant des microcellules électrochimiques. Le substrat, la structuration pour former cette zone de travail, le traitement de la surface du substrat destiné à la rendre sensiblement non mouillante, et la structuration de la surface destinée à former la zone de capture 15 d'une goutte du liquide d'intérêt sont définis ci-dessus. Le polymère peut être par exemple l'un quelconque des polymères utilisés pour la fabrication de puces biologiques, par exemple du polypyrrole, de la polyaniline, du polyazulène, d'un polythiophène, 20 polyindole, polyfurane, polyfluorène.

L'invention a donc pour objet principal un procédé permettant la formation d'une matrice à haute densité de gouttes d'un liquide d'intérêt sur une 25 surface, dans une chambre fluidique (boîte), de préférence fermée, avec uniquement des connexions de fluide. Il n'est donc nécessaire de faire appel à un système extérieur (appareillage de distribution de gouttes) de dispense de gouttes. Le procédé de 30 l'invention permet de réaliser très facilement et très rapidement une telle matrice de gouttes, et à un coût

très réduit (pas d'appareillage de distribution de gouttes). Toutes les applications possibles du procédé de l'invention bénéficient de ces avantages.

L'application la plus basique du procédé de l'invention est la fabrication de laboratoires sur puce ou microsystèmes d'analyse. En effet, le liquide d'intérêt peut comprendre tous les éléments chimiques nécessaires à la fabrication de laboratoires et microsystèmes, par exemple un monomère pour sa polymérisation localisée à l'endroit de chaque goutte sur la surface active, un tel monomère fonctionnalisé par une sonde, une sonde à fixer sur un polymère de manière localisée à l'endroit de chaque goutte du liquide d'intérêt, des réactifs chimiques et/ou biochimiques à déposer de manière localisée sur une surface, des marqueurs, etc.

Dans des procédés de chimie ou de biochimie, et/ou dans des procédés d'analyse, à plusieurs étapes utilisant le procédé de l'invention, il n'est pas nécessaire que toutes les étapes conduisent à la formation de gouttes. En effet, rien n'empêche que certaines étapes soient réalisées en couvrant la totalité des zones de capture par un liquide puis en vidant la boîte de ce liquide de telle manière qu'il ne reste pas de gouttes captives par les zones de capture (par exemple par injection dans la boîte d'un gaz sous pression ou par agitation énergique, etc).

Il est par ailleurs possible de capturer successivement différentes gouttes d'un ou de plusieurs liquides d'intérêt sur une même zone de travail grâce à la zone de capture qui l'entoure. Chaque liquide

d'intérêt peut contenir un ou plusieurs réactif(s) nécessaire(s) par exemple pour réaliser une des étapes d'un procédé de chimie ou biochimie, par exemple pour fabriquer les zones de travail et/ou ou pour effectuer 5 des analyses. La succession des différentes gouttes sur une même zone de travail permet par exemple de réaliser différentes étapes successives d'un procédé mis en œuvre grâce au procédé de l'invention sur les zones de travail entourées par leur zone de capture. L'ensemble 10 de ces étapes de procédé est donc avantageusement localisé sur les zones de travail.

Cette invention peut s'appliquer dans des domaines très variés. Ainsi, les microsystèmes pour la 15 chimie et la biologie, communément appelés Laboratoire sur Puce (LOC) ou MicroSystème d'Analyse Totale (δTAS) pourront bénéficier de cette invention pour tous les cas où il est nécessaire de travailler avec des densités élevées de sites sur une surface et 20 d'effectuer en deux temps une étape collective, puis une étape individuelle. Par exemple, les puces à ADN ou à protéines sont concernées par cette invention. En outre, cette invention peut s'appliquer partout où il est nécessaire de former des matrices contrôlées de 25 gouttes ou de produits : séchage localisé de produits pharmaceutiques, formation de tâches (« spots ») colorés, greffage localisé de molécules à analyser qualitativement et/ou quantitativement. Par ailleurs, ce nouveau procédé permet de travailler en très faible 30 volume et donc d'envisager des applications où il faut être économe en réactifs : par exemple catalyse

homogène, molécules à haute valeur ajoutée de chimie pharmaceutique.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention se présenteront encore à l'homme du métier à la lecture des exemples qui suivent donnés à titre illustratif et non limitatif en référence aux figures annexées.

10 **Brève description des figures**

- La figure 1 est un schéma représentant en coupe transversale un exemple de mise en œuvre du procédé de la présente invention pour la création d'une matrice de gouttes.

15 - La figure 2 est une représentation schématique de différents modes de réalisations possibles du procédé de l'invention en utilisant différentes boîtes fermées, qui diffèrent notamment par la disposition des ouvertures d'entrée et de sortie du liquide d'intérêt.

20 - La figure 3 est un schéma représentant en coupe transversale un dispositif utilisable pour la mise en œuvre du procédé de l'invention dans lequel les moyens d'introduction du liquide d'intérêt dans la boîte fermée et d'extraction du liquide d'intérêt de la boîte utilisent une même ouverture de cette boîte.

25 - La figure 4 est un schéma en vue du dessus, réalisé à partir de photographies expérimentales, d'une surface active (S) sur laquelle une matrice de gouttes est formée en utilisant le procédé de la présente invention : à gauche la surface sans gouttes avant la

mise en œuvre de ce procédé, et à droite, la surface avec la matrice de gouttes (g) retenues par les zones de capture (Zc) lorsque le liquide d'intérêt a été extrait de la boîte, dans la dernière étape du procédé de l'invention.

- Les figures 5, 6 et 7a) à 7c) représentent schématiquement différentes formes de zones de capture utilisables pour la mise en œuvre du procédé de la présente invention, notamment lorsque ces zones entourent une zone de travail.

- La figure 8 représente schématiquement un dispositif utilisable pour la mise en œuvre du procédé de l'invention, dans lequel la zone de travail est un microsystème électrochimique.

15 - Les figures 9a) et 9b) sont deux photographies illustrant la mise en œuvre du procédé de l'invention sur un dispositif dans lequel la zone de travail est une microcellule électrochimique : la figure 9a) avant capture d'une goutte du liquide 20 d'intérêt, et la figure 9b) après capture d'une goutte du liquide d'intérêt.

- La figure 10 est un graphique montrant la détection, au niveau d'une zone de travail, d'un produit d'une réaction enzymatique au sein d'une goutte capturée par la mise en œuvre de la présente invention.

- La figure 11 est une représentation schématique en coupe de deux types de cuvettes : à gauche les cuvettes de l'art antérieur, et à droite les cuvettes conformes à la présente invention.

**EXEMPLES**

Dans ces exemples, la structuration du substrat pour former les zones de capture de gouttes du liquide d'intérêt est généralement annulaire, de manière à 5 dégager une zone de travail au centre de chaque zone de capture.

**Exemple 1 : exemple de fabrication d'une surface active non mouillante vis-à-vis d'un liquide d'intérêt aqueux**

10 Un substrat de silicium (Si) avec une couche supérieure d'oxyde de silicium ( $\text{SiO}_2$ ) de 300 nm est traité avec un silane hydrophobe (1H, 1H, 2H, 2H perfluorodécylique-trichlorosilane) pour rendre la surface hydrophobe.

15 Le protocole est le suivant : après traitement dans un mélange soude/eau/éthanol à 3,5 M pendant 2 heures à température ambiante pour générer les sites silanols, le substrat est placé pendant 10 minutes à température ambiante dans un mélange toluène 20 anhydre/silane hydrophobe à 9 mM en concentration de silane. Il est ensuite lavé avec du toluène puis de l'acétone, puis de l'éthanol et finalement nettoyé aux ultrasons pendant 5 minutes dans l'éthanol. Le substrat est ensuite placé dans une étuve pendant 1 heure à 25 110°C. L'angle de contact mesuré avec l'eau est de 110°.

Exemple 2 : fabrication d'une zone de capture constituée d'un matériau support disposé sur la surface active utilisable pour la mise en œuvre du procédé de l'invention

5 Sur substrat de Si avec une couche de SiO<sub>2</sub> de 300 nm, réalisation d'étapes standard pour l'homme du métier de la microélectronique :

- dépôt de 300 nm de platine (Pt) par pulvérisation ;
- 10 - photolithographie dans une résine photosensible avec ouverture d'un motif circulaire relié à une bande d'arrivée de courants ;
- dans un réacteur à plasma, gravure ionique complète du Pt dans les zones sans résine ;
- 15 - retrait de la résine dans un bain d'acide nitrique ;
- dans un réacteur à plasma, dépôt chimique en phase vapeur de 500nm de SiO<sub>2</sub> ;
- photolithographie dans une résine photosensible
- 20 - avec ouverture du motif circulaire ;
- dans un réacteur à plasma, gravure ionique complète de 500nm de SiO<sub>2</sub> dans les zones sans résine ; et
- retrait de la résine dans un bain d'acide nitrique.

30 La figure 7a est une représentation schématique d'une zone de capture circulaire constituée d'un matériau support et entourant une zone de travail obtenue.

**Exemple 3 : fabrication d'une zone de capture constituée de silicium noir utilisable pour la mise en œuvre du procédé de l'invention**

Sur un substrat de Si (toutes ces étapes sont très bien connues de l'homme du métier de la microélectronique) :

- photolithographie dans une résine photosensible avec ouverture d'un motif en couronne ;
- dans un réacteur à plasma, gravure réactive ionique d'environ 30μm de silicium suivant le protocole décrit dans le document [11] pour former du silicium noir ;
- nettoyage de la surface en fin de gravure par passage dans un réacteur à plasma Plassys MDS 150 (société Passis, France) avec les conditions suivantes : puissance 500W, temps de réaction 4 minutes, pression 21,33 Pa (160 mTorrs), débit d'oxygène 25cm<sup>3</sup>/min., température ambiante ; et
- retrait de la résine dans un bain d'acide nitrique.

Le silicium noir formé sur ces zones déterminées est fortement hydrophile, tandis que le silicium est sensiblement non mouillant vis-à-vis des liquides d'intérêt aqueux (échantillons).

Les figures 5 et 6 montrent schématiquement différentes zones de captures formées autour de leur zone(s) de travail. La structuration fine a été réalisée de manière à créer une bande de silicium noir, ouverte ou fermée, qui constitue la zone de capture

Exemple 3 : fabrication d'une zone de capture constituée de silicium noir utilisable pour la mise en œuvre du procédé de l'invention

Sur un substrat de Si (toutes ces étapes sont très bien connues de l'homme du métier de la microélectronique) :

- photolithographie dans une résine photosensible avec ouverture d'un motif en couronne ;
- dans un réacteur à plasma, gravure réactive ionique d'environ 3µm de silicium suivant le protocole décrit dans le document [11] pour former du silicium noir ;
- nettoyage de la surface en fin de gravure par passage dans un réacteur à plasma Plassys MDS 150 (société Plassis, France) avec les conditions suivantes : puissance 500W, temps de réaction 4 minutes, pression 21,33 Pa (160 mTorr), débit d'oxygène 25cm<sup>3</sup>/min., température ambiante ; et
- retrait de la résine dans un bain d'acide nitrique.

Le silicium noir formé sur ces zones déterminées est fortement hydrophile, tandis que le silicium est sensiblement non mouillant vis-à-vis des liquides d'intérêt aqueux (échantillons).

Les figures 5 et 6 montrent schématiquement différentes zones de captures formées autour de leur zone(s) de travail. La structuration fine a été réalisée de manière à créer une bande de silicium noir, ouverte ou fermée, qui constitue la zone de capture

(Zc), autour d'une zone prévue pour former la zone de travail (Zt). Sur la figure 6, une zone de capture est aménagée autour de deux (à droite) ou quatre (à gauche) zones de travail.

5 La zone gravée ne nécessite pas d'autre modification chimique. Ce dispositif de l'invention est destiné à être utilisés avec des liquides d'intérêt aqueux.

10 Exemple 4 : fabrication d'une zone de capture sous forme d'une électrode de capture par mouillage utilisable pour la mise en œuvre du procédé de l'invention

4.1 ZONE DE CAPTURE SOUS FORME D'UNE ELECTRODE DE  
15 CAPTURE :

Sur un substrat de Si avec une couche de SiO<sub>2</sub> de 300 nm, les étapes suivantes sont réalisées :

20 α) Les mêmes étapes que dans l'exemple 2 sont réalisées pour disposer une électrode (matériau support) sur la surface active.

β) Réalisation de la surface active non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt sur l'ensemble du substrat pour le rendre hydrophobe comme dans l'exemple 1. L'électrode est ensuite nettoyée par voie chimique avec une solution de soude/eau/éthanol. Pour ce faire, une goutte d'un mélange soude/eau/éthanol à 3,5 M est déposée sur les électrodes pendant 2 heures à température ambiante. Les électrodes sont ensuite lavées à l'eau puis séchées.

δ) Dans des expérimentations supplémentaires, une barrière hydrophile a été réalisée sur l'électrode par électropolymérisation en conditions potentiostatiques d'un pyrrole porteur de fonctions alcools (fonctions mouillantes vis-à-vis d'un liquide d'intérêt aqueux) en position 3. Ce polypyrrrole est généré à partir d'une solution de pyrrole-3-éthanol 100 mM et de perchlorate de lithium ( $\text{LiClO}_4$ ) 0,5 M. Un potentiel de 1 V vs Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> est appliqué pendant 5 secondes. L'angle de contact mesuré avec l'eau sur l'électrode est de 53°.

La figure 7a est une représentation schématique d'un dispositif selon l'invention obtenu en utilisant le protocole de cet exemple. Sur cette figure, la zone de capture (Zc), entourant la zone de travail (Zt), est formée par une électrode recouverte d'un polypyrrrole porteur de fonctions mouillantes (fonctions alcools).

**4.2 ZONE DE CAPTURE SOUS FORME D'UNE BANDE MOUILLANTE :**

Sur un substrat de Si avec une couche de  $\text{SiO}_2$  de 300nm, les étapes suivantes ont été réalisées :

30 α) Réalisation de la surface active non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt sur l'ensemble du substrat pour le rendre hydrophobe comme dans l'exemple 1.

β) Photolithographie dans une résine photosensible de type négative (référence NFR-015 du

γ) Dans des expérimentations supplémentaires, une barrière hydrophile a été réalisée sur l'électrode par électropolymérisation en conditions potentiostatiques d'un pyrrole porteur de fonctions alcools (fonctions mouillantes vis-à-vis d'un liquide d'intérêt aqueux) en position 3. Ce polypyrrrole est généré à partir d'une solution de pyrrole-3-éthanol 100 mM et de perchlorate de lithium ( $\text{LiClO}_4$ ) 0,5 M. Un potentiel de 1 V vs Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> est appliqué pendant 5 secondes. L'angle de contact mesuré avec l'eau sur l'électrode est de 53°.

La figure 7a est une représentation schématique d'un dispositif selon l'invention obtenu en utilisant le protocole de cet exemple. Sur cette figure, la zone de capture (Zc), entourant la zone de travail (Zt), est formée par une électrode recouverte d'un polypyrrrole porteur de fonctions mouillantes (fonctions alcools).

#### 4.2 ZONE DE CAPTURE SOUS FORME D'UNE BANDE MOUILLANTE :

Sur un substrat de Si avec une couche de  $\text{SiO}_2$  de 300nm, les étapes suivantes ont été réalisées :

- α) Réalisation de la surface active non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt sur l'ensemble du substrat pour le rendre hydrophobe comme dans l'exemple 1.
- β) Photolithographie dans une résine photosensible de type négative (référence NFR-015 du

fournisseur Shipley) avec une ouverture d'un motif en couronne, pour former la zone de capture (ou bande mouillante) ;

5 δ) Destruction du silane hydrophobe dans les motifs ouverts de la résine photosensible par passage dans un réacteur à plasma Plassys MDS 150 (société Plassys, France) avec les conditions suivantes : puissance 500W, temps de réaction 4 minutes, pression 21,33 Pa (160 mTorr), débit d'oxygène 25cm<sup>3</sup>/min., température ambiante ; et

10 δ) Réalisation de la zone de capture par silanisation avec un silane porteur de fonctions amines (fonctions mouillantes pour le liquide d'intérêt aqueux). Le substrat est placé dans une solution de δ-aminopropyl triéthoxysilane à 10% en volume dans l'éthanol. Après une nuit à température ambiante, le substrat est lavé à l'éthanol et enfin laissé pendant trois heures dans une étuve à 110°C.

15

20

Exemple 5 : fabrication de zones de capture constituées de bordures utilisables pour la mise en œuvre du procédé de l'invention

25 Sur une plaque neuve de silicium est effectuée une étape de photolithographie avec une résine épaisse photosensible Clariant AZ4562 (marque de commerce) de la manière suivante :

30 - dépôt d'un promoteur d'adhérence, qui est ici de l'hexaméthylènedisilazane, en four à 120°C,

fournisseur Shipley) avec une ouverture d'un motif en couronne, pour former la zone de capture (ou bande mouillante) ;

γ) Destruction du silane hydrophobe dans les motifs ouverts de la résine photosensible par passage dans un réacteur à plasma Plassys MDS 150 (société Plassys, France) avec les conditions suivantes : puissance 500W, temps de réaction 4 minutes, pression 21,33 Pa (160 mTorr), débit d'oxygène 25cm<sup>3</sup>/min., température ambiante ; et

δ) Réalisation de la zone de capture par silanisation avec un silane porteur de fonctions amines (fonctions mouillantes pour le liquide d'intérêt aqueux). Le substrat est placé dans une solution de γ-aminopropyl triéthoxysilane à 10% en volume dans l'éthanol. Après une nuit à température ambiante, le substrat est lavé à l'éthanol et enfin laissé pendant trois heures dans une étuve à 110°C.

Exemple 5 : fabrication de zones de capture constituées de bordures utilisables pour la mise en œuvre du procédé de l'invention

Sur une plaque neuve de silicium est effectuée une étape de photolithographie avec une résine épaisse photosensible Clariant AZ4562 (marque de commerce) de la manière suivante :

- dépôt d'un promoteur d'adhérence, qui est ici de l'hexaméthylénedisilazane, en four à 120°C,

- couchage de résine sur tournette à 1000 tour/minute pendant 30 s avec une accélération de 200 tours/minute/s,
- 5 recuit sur plaque chauffante 115°C pendant 2 minutes,
- insolation sur machine d'insolation Karl Süss MA750 (marque de commerce) pendant 50 s en mode discontinu (5x10 secondes avec 5 secondes de pause) à travers un masque,
- 10 - développement dans une solution Shipley MF319 (marque de commerce) diluée dans les proportions 1:3 avec de l'eau désionisée,
- rinçage à l'eau désionisée et séchage sous flux d'azote,
- 15 - recuit sur plaque chauffante à 115°C pendant 3 minutes, puis à 150°C pendant 1 minute,
- mesure d'épaisseur : 13  $\delta$ m.

Sur le masque utilisé pour l'insolation, tous les motifs représentent des anneaux dont les murets ont une largeur de 35  $\delta$ m avec des combinaisons variées entre leur diamètre (100 à 1000  $\delta$ m) et la distance inter-centre entre deux bordures (couronnes) (50 à 1000  $\delta$ m).

25 3025 cuvettes (c) sur une surface de 1 centimètre carré ont pu être obtenues aisément.

La figure 11, à droite, représente schématiquement les zones de captures (Zc) obtenues, sous la forme de bordures. Ces zones de captures 30 forment des cuvettes (c) capables de capturer une goutte (g) d'un liquide d'intérêt.

- couchage de résine sur tournette à 1000 tour/minute pendant 30 s avec une accélération de 200 tours/minute/s,
- 5 recuit sur plaque chauffante 115°C pendant 2 minutes,
- insolation sur machine d'insolation Karl Süss MA750 (marque de commerce) pendant 50 s en mode discontinu (5x10 secondes avec 5 secondes de pause) à travers un masque,
- 10 - développement dans une solution Shipley MF319 (marque de commerce) diluée dans les proportions 1:3 avec de l'eau désionisée,
- rinçage à l'eau désionisée et séchage sous flux d'azote,
- 15 - recuit sur plaque chauffante à 115°C pendant 3 minutes, puis à 150°C pendant 1 minute,
- mesure d'épaisseur : 13 µm.

20 Sur le masque utilisé pour l'insolation, tous les motifs représentent des anneaux dont les murets ont une largeur de 35 µm avec des combinaisons variées entre leur diamètre (100 à 1000 µm) et la distance inter-centre entre deux bordures (couronnes) (50 à 1000 µm).

25 3025 cuvettes (c) sur une surface de 1 centimètre carré ont pu être obtenues aisément.

La figure 11, à droite, représente schématiquement les zones de capturés (Zc) obtenues, sous la forme de bordures. Ces zones de captures 30 forment des cuvettes (c) capables de capturer une goutte (g) d'un liquide d'intérêt.

**Exemple 6 : Fabrication de zones de travail fonctionnalisées par une sonde utilisables dans le procédé de l'invention**

5        Dans cet exemple, une zone de travail comprenant quatre électrodes est fabriquée et utilisée. Sur un substrat de Si avec une couche de SiO<sub>2</sub> de 300 nm, réalisation d'étapes standard pour l'homme du métier de la microélectronique :

10        - dépôt de 300 nm de platine (Pt) par pulvérisation ;

15        - photolithographie dans une résine photosensible avec ouverture des motifs de la microcellule, de l'électrode de capture et des bandes d'arrivée de courants ;

20        - dans un réacteur à plasma, gravure ionique complète du Pt dans les zones sans résine ;

25        - retrait de la résine dans un bain d'acide nitrique ;

30        - dans un réacteur à plasma, dépôt chimique en phase vapeur de 500nm SiO<sub>2</sub> ;

35        - photolithographie dans une résine photosensible avec ouverture des motifs des électrodes de la microcellule et de l'électrode de capture ;

40        - dans un réacteur à plasma, gravure ionique complète de 500nm de SiO<sub>2</sub> dans les zones sans résine ; et

45        - retrait de la résine dans un bain d'acide nitrique.

L'électrode de travail (We) (voir fig. 8), la contre-électrode (CE) et l'électrode annexe utilisée pour former la zone de capture (Zc) sont en platine (dépôt 5000 Å environ). Une électrode de référence 5 Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> (Rf) est également présente (voir figure 8).

Une électrode de référence Ag/AgCl/Cl<sup>-</sup> (Rf) est également présente. Cette électrode est obtenue par dépôt d'argent sur le platine avec le protocole 10 suivant :

- préparation de 10 ml de solution contenant AgNO<sub>3</sub> 0,2 M, KI 2 M, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 0,5 mM ;
- un potentiel de -0,65 V vs ECS (électrode au calomel saturé) est imposé pendant 90 secondes 15 (suivi par chronoampérométrie) sur l'électrode de référence. Un dépôt gris/blanc est obtenu. La zone de travail est ensuite rincée à l'eau ; et
- la zone de travail avec l'électrode modifiée précédemment est plongée dans une solution de HCl 0,1 M et on impose un potentiel de 0,5 V vs ECS pendant 30 secondes pour chlorer le dépôt 20 d'argent. Le substrat est ensuite rincé à l'eau.

25 L'ensemble de chaque zone de travail a été silanisé avec un silane hydrophobe suivant le protocole décrit dans l'exemple 1.

La barrière hydrophile est réalisée sur l'électrode de capture selon le protocole décrit dans 30 l'exemple 4.1-δ.

La contre-électrode (CE) est ensuite fonctionnalisée avec un copolymère conducteur pyrrole/pyrrole fonctionnalisé en position 1 par la fonction biologique (ici un oligonucléotide sonde) [5].

5 L'électropolymérisation est localisée sur la contre-électrode de la zone de travail.

Pour tester cette zone de travail, l'oligonucléotide sonde est hybridé avec un oligonucléotide cible (100 pM) porteur d'un marqueur 10 enzymatique (HRP "Horse Radish Peroxidase") dans un tampon (NaCl 1 M/Tris 10 mM/EDTA 1 mM/Triton X100 0,05%). Après des lavages dans le même tampon mais sans triton, la solution de révélation (OPD + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + tampon phosphate-citrate 50 mM) est introduite sur le 15 dispositif de la présente invention puis aspirée. Une fraction de liquides est bien laissée de manière localisée sur la zone de travail comme le montrent les photographies de la figure 9 :

- à gauche, avant que le dispositif ne soit 20 recouvert de la solution de révélation, on distingue le dispositif de la présente invention sans la goutte ; et - à droite, après que la solution de révélation ait été aspirée, on distingue le dispositif 25 de la présente invention ayant capturé grâce à sa zone de capture (bande hydrophile) une goutte de la solution de révélation.

Après 5 minutes de révélation, le produit enzymatique est détecté par voltampérométrie pulsée différentielle sur l'électrode de mesure (WE). Les 30 résultats de cette détection sont représentés par le graphique de la figure 10 annexée.

La figure 8 est une représentation schématique d'une microcellule électrochimique d'un dispositif selon l'invention obtenu en utilisant le protocole de cet exemple. Sur cette figure, la zone de travail est 5 constituée de l'électrode de mesure ou électrode de travail (WE), du polymère conducteur porteur de l'oligonucléotide (Po) déposé sur la contre-électrode (CE) et de la zone de capture (Zc) formée par l'électrode la plus externe sur laquelle le polymère 10 porteur des fonctions alcools a été déposé (Pm). L'ensemble est réalisé sur la surface active (Sa) non mouillante.

15 **Exemple 7 : Fabrication d'une boîte convenant à la mise en œuvre du procédé de l'invention**

Un capot creux en polydiméthylsiloxane (PDMS) est fabriqué par moulage sur un moule en verre avec un motif carré en surépaisseur de 1 mm.

20 Sur un dispositif de la présente invention plan comme ceux obtenus dans les exemples précédents, ce capot creux est fixé de manière hermétique par collage avec de la colle réticulant par insolation aux rayons ultraviolets (VITRALIT 6181). Les connexions pour les entrées et sorties des fluides sont réalisées par 25 perçage du capot avec des aiguilles de faible diamètre. L'aiguille d'entrée est reliée à des tubes de transport de fluide et à une seringue pleine du liquide d'intérêt. L'ensemble final est testé pour détecter d'éventuelles fuites, sachant que le liquide doit 30 passer uniquement par les connexions prévues à cet effet.

La figure 3 est une représentation schématique de la boîte obtenue dans cet exemple.

D'autres dispositions des connexions d'entrée et de sortie peuvent facilement être réalisées, et la 5 figure 2 fournit des représentations schématiques de différentes boîtes. Sur cette figure, B1, B2 et B3 représentent trois types de boîtes selon l'invention avec des ouvertures d'entrée (o) et de sortie (s) placées différemment. Sb, Sa, Zc, Zt ont la même 10 signification que sur les figures précitées. Les différents éléments qui la constituent la boîte de l'invention sont représentés de la même manière sur les trois schémas.

La figure 4 est une représentation schématique 15 vue du dessus d'une surface active qui est utilisée pour fabriquer une boîte selon l'invention. Cette surface active comporte 12 zones de capture et 12 zones de travail correspondantes. La surface active est non mouillante vis-à-vis du substrat. Différentes formes de 20 zones de capture utilisable pour la mise en œuvre du procédé de l'invention ont été fabriquées, en particulier en anneau ou en disque. Elles sont représentées sur les figures 5 et 6.

25 **Exemple 8 : Mise en œuvre du procédé de l'invention pour la répartition localisée de gouttes et résultats**

La mise en œuvre du procédé de l'invention est testée sur des boîtes fabriquées suivant l'exemple 7 précédent, avec les différentes zones de capture 30 fabriquées suivant les exemples 2 à 6 ci-dessus.

La figure 1 représente le fonctionnement d'une boîte fermée avec une première ouverture (o) d'introduction du liquide d'intérêt dans la boîte, et une deuxième ouverture (s) d'extraction du liquide 5 d'intérêt de la boîte : le liquide d'intérêt E est injecté dans la boîte (schéma du haut) par la première ouverture (o) jusqu'à remplissage (schéma du milieu), puis extrait par la deuxième ouverture (s) (schéma du bas). Le moyen d'injection utilisé est une seringue, et 10 le moyen d'extraction utilisé est une seringue. Une matrice de gouttes (g) est obtenue sur la surface active comme représentée sur la figure 4 annexée, grâce aux zones de capture (Zc).

La figure 3 représente le fonctionnement d'une 15 boîte fermée avec une première ouverture (o) d'introduction du liquide d'intérêt dans la boîte et d'extraction du liquide d'intérêt de la boîte, et une deuxième ouverture (s) laissant de l'air contenu dans la boîte sortir lors de l'introduction du liquide 20 d'intérêt dans celle-ci, et entrer dans la boîte lors de l'extraction du liquide d'intérêt. Le liquide d'intérêt E est injecté puis extrait de la boîte par la une seule ouverture. Une matrice de gouttes (g) est obtenue comme représenté sur la figure 4 annexée.

25 Cet exemple montre qu'une matrice de gouttes (g) bien localisées sur les différentes zones de capture est obtenue grâce au procédé de la présente invention. Le remplissage de la boîte n'est pas obligatoire, pourvu que les différentes zones de 30 capture soient couvertes par le liquide d'intérêt.

Des expérimentations réalisées avec différentes formes de zones de capture, comme les formes représentées sur les figures 5 et 6 montrent que ces zones de capture arrangées avec des zones de travail 5 sont également fonctionnelles pour la mise en œuvre du procédé de l'invention.

**Exemple 9 : Procédé de détection électrochimique**

Une boîte est fabriquée suivant le protocole de 10 l'exemple 7, avec des zones de capture et des zones de travail fabriquées suivant l'exemple 6.

Le liquide d'intérêt est constitué d'une solution de révélation comprenant le substrat de l'enzyme HR P : eau oxygénée ( $H_2O_2$ ) et chromogène OPD 15 (OrthoPhénylène Diamine). Cette solution est introduite dans la boîte fermée de manière à recouvrir les zones de capture, puis aspirée hors de cette boîte.

Des gouttes du liquide d'intérêt sont bien 20 capturées par les zones de capture, et couvrent les zones de travail comme le montrent les photographies de la figure 9 annexée :

- à gauche, avant que la surface active ne soit recouverte du liquide d'intérêt : on distingue la zone de travail sans goutte ; et

25 - à droite, après que le liquide d'intérêt ait été aspiré : on distingue la zone de capture ayant capturé une goutte du liquide d'intérêt.

Après 5 minutes de repos servant à la révélation de la réaction enzymatique, le produit 30 enzymatique est détecté par voltampérométrie pulsée

différentielle. Les résultats de cette détection sont représentés sur le graphique de la figure 10 annexée.

La zone de capture entourant la zone de travail est donc bien fonctionnelle, et le procédé de 5 l'invention permet bien de détecter un analyte dans chaque goutte capturée.

**Exemple 10 : Procédé d'électropolymérisation**

Une boîte de travail est fabriquée suivant le 10 protocole de l'exemple 7, avec des zones de capture et des zones de travail fabriquées suivant l'exemple 6.

Comme dans exemple 6 ci-dessus une polymérisation de pyrrôle fonctionnalisé ou non a été obtenue de manière localisée aux gouttes capturées par 15 les zones de capture.

## Liste des références

[1] WO 02/16023: Protogene Laboratories Inc.

[2] US 6,040,193: Affymetrix Inc.

5 [3] WO 99/03684 : Eapen Saji et col.

[4] Azek et al., *Analytical Biochemistry*, 2000, 284, 107-113.

[5] WO 00/36145 : Commissariat à l'Energie Atomique.

[6] WO 02/090573 : Infineon

10 [7] Junghoon Lee et al., "Electrowetting and Electrowetting-on-dielectric for microscale liquid handling", *Sensor and Actuators A* 95 (2002), 259-268.

[8] J. Cooper et al., "Micromachining Sensor for Electrochemical Measurement in Subnanoliter Volumes", *Anal. Chem.* 1997, 69, 253-258.

15 [9] Mengsu Yang et al., "Covalent Immobilisation of Oligonucleotides on Modified Glass/Silicon Surfaces for Solid-Phase DNA Hybridization and Amplification", *Chemistry Letters* 1998, 257-258.

[10] Mila Boncheva et al., "Design of Oligonucleotide Arrays at Interfaces" *Langmuir* 1999, 15, 4317-4320.

20 [11] H. Jansen et al., "The black silicon method : a universal method for determining the parameter setting of a fluorine-based reactive ion etcher in deep silicon trench etching with profile control", *J. Micromech. Microeng.* 5 (1995), 115-120.

25 [12] FR-A-2 818 662.

[13] EP-B-561 722.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de répartition localisée de gouttes d'un liquide d'intérêt sur une surface active d'un substrat, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- une introduction du liquide d'intérêt dans une boîte via des moyens d'introduction, ladite boîte enfermant ladite surface active, et
- 10 - une extraction du liquide d'intérêt de ladite boîte via des moyens d'extraction,

15 ladite surface active ainsi que les autres surfaces à l'intérieur de la boîte étant sensiblement non mouillantes vis à vis du liquide d'intérêt à l'exception de plusieurs zones de capture localisées, formées de manière déterminée sur ladite surface active, qui sont chacune appropriées pour capturer une goutte du liquide d'intérêt,

20 lesdits moyens d'introduction et d'extraction du liquide d'intérêt dans la boîte étant disposés de telle manière que lorsque le liquide d'intérêt est introduit dans la boîte, il couvre lesdites zones de capture, et lorsque le liquide d'intérêt est extrait de la boîte, une goutte dudit liquide d'intérêt reste 25 captive de manière répartie et localisée sur chaque zone de capture.

30 2. Procédé selon revendication 1, dans lequel chaque zone de capture est arrangée avec au moins une zone de travail formée sur ladite surface active de

telle manière que cette zone de travail soit en contact avec la goutte de liquide d'intérêt captive.

3. Procédé selon la revendication 2, dans  
5 lequel au moins une zone de travail est une zone non mouillante vis-à-vis du liquide d'intérêt.

4. Procédé selon la revendication 2 ou 3, dans  
lequel au moins une zone de capture a une forme  
10 annulaire, ouverte ou fermée qui entoure la, au moins une, zone de travail arrangée avec elle.

5. Procédé selon la revendication 4, dans  
lequel la zone de capture de la goutte du liquide  
15 d'intérêt entoure plusieurs zones de travail.

6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel la zone de travail est une zone de détection d'une espèce chimique  
20 susceptible d'être présente dans le liquide d'intérêt.

7. Procédé selon la revendication 6, dans lequel la zone de travail est une zone fonctionnalisée par une sonde biologique.

25

8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel la sonde est choisie dans le groupe constitué par une enzyme, un substrat d'enzyme, un oligonucléotide, un oligonucléoside, une protéine, un  
30 récepteur membranaire d'une cellule eucaryote ou procaryote, un anticorps, un antigène, une hormone, un

métabolite d'un organisme vivant, une toxine d'un organisme vivant, un polynucléotide, un polynucléoside, un ADN complémentaire.

5           9. Procédé selon la revendication 6, dans lequel la zone de travail est une zone fonctionnalisée par une molécule chimique.

10          10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, dans lequel la zone de travail est une zone d'interaction électrique et/ou chimique avec ladite goutte captive.

15          11. Procédé selon la revendication 10, dans lequel la zone de travail est une microcellule électrochimique.

20          12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, dans lequel la zone de travail comprend un capteur choisi dans le groupe constitué des capteurs optiques, électriques, magnétiques, électrostatiques, mécaniques, thermiques et chimiques.

25          13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 9, dans lequel la zone de travail comprend un actionneur choisi dans le groupe constitué des actionneurs optiques, électriques, magnétiques, électrostatiques, mécaniques, thermiques et chimiques.

30          14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel au moins une

des zones de capture d'une goutte du liquide d'intérêt est une zone de capture électrique ou physique.

15. Procédé selon la revendication 14, dans  
5 lequel la zone de capture capture la goutte du liquide d'intérêt par des forces capillaires.

16. Procédé selon la revendication 14, dans  
lequel la zone de capture capture localement la goutte  
10 de liquide d'intérêt par mouillage.

17. Procédé selon la revendication 16, dans  
lequel la zone de capture capture localement la goutte  
de liquide d'intérêt du fait d'une mouillabilité de la  
15 zone de capture pour le liquide d'intérêt plus  
importante que celle de la surface active.

18. Procédé selon la revendication 16, dans  
lequel la zone de capture capture localement la goutte  
20 de liquide d'intérêt par électro-mouillage.

19. Procédé selon la revendication 14, dans  
lequel la zone de capture capture la goutte de liquide  
d'intérêt par des interactions de type  
25 hydrophile/hydrophobe avec le liquide d'intérêt.

20. Procédé selon l'une quelconque des  
revendications précédentes, dans lequel au moins une  
des zones de capture est en creux ou en saillie par  
30 rapport à la surface active sur laquelle elle est  
formée.

21. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les zones de capture localisées, réparties de manière déterminée sur 5 ladite surface active, forment une matrice.

22. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans lequel les moyens d'extraction de liquide d'intérêt étant des moyens 10 d'aspiration de celui-ci hors de la boîte, l'étape d'extraction consiste à aspirer le liquide d'intérêt de ladite boîte.

23. Procédé selon l'une quelconque des 15 revendications précédentes, dans lequel les moyens d'extraction de liquide d'intérêt étant des moyens d'injection d'un fluide gazeux dans la boîte, l'étape d'extraction consiste à injecter un fluide gazeux dans la boîte de manière à expulser le liquide d'intérêt de 20 ladite boîte.

24. Procédé selon la revendication 23, dans lequel le fluide gazeux injecté est saturé en vapeur de liquide d'intérêt.

25. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans un laboratoire sur puce ou dans un microsystème pour la chimie ou la biologie.

26. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes dans une puce biologique choisie dans le groupe constitué des puces à ADN, des puces à ARN, des puces à protéines, des puces à 5 anticorps, des puces à antigènes, des puces à cellule.

27. Procédé de détection d'au moins une molécule susceptible d'être présente dans un liquide 10 d'intérêt, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- répartition localisée de gouttes de liquide d'intérêt liquide sur une surface active dans une boîte suivant le procédé de la revendication 1, et
- 15 - détection électrochimique dans lesdites gouttes, de la, au moins une, molécule susceptible d'être présente dans ledit liquide d'intérêt.

28. Procédé de détection optique d'au moins une 20 molécule susceptible d'être présente dans un liquide d'intérêt, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- une répartition localisée de gouttes de liquide d'intérêt sur une surface active dans une boîte 25 suivant le procédé de la revendication 1, et
- détection optique dans lesdites gouttes, de la, au moins une, molécule susceptible d'être présente dans ledit liquide d'intérêt.

30 29. Procédé selon la revendication 27 ou 28, dans lequel des détections de molécules différentes

26. Utilisation d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 25 dans une puce biologique choisie dans le groupe constitué des puces à ADN, des puces à ARN, des puces à protéines, des puces à 5 anticorps, des puces à antigènes, des puces à cellule.

27. Procédé de détection d'au moins une molécule susceptible d'être présente dans un liquide 10 d'intérêt, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- répartition localisée de gouttes de liquide d'intérêt liquide sur une surface active dans une boîte suivant le procédé de la revendication 1, et

15 - détection électrochimique dans lesdites gouttes, de la, au moins une, molécule susceptible d'être présente dans ledit liquide d'intérêt.

28. Procédé de détection optique d'au moins une 20 molécule susceptible d'être présente dans un liquide d'intérêt, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- une répartition localisée de gouttes de liquide d'intérêt sur une surface active dans une boîte 25 suivant le procédé de la revendication 1, et

- détection optique dans lesdites gouttes, de la, au moins une, molécule susceptible d'être présente dans ledit liquide d'intérêt.

30 29. Procédé selon la revendication 27 ou 28, dans lequel des détections de molécules différentes

susceptibles d'être présentes dans le liquide d'intérêt sont réalisées en parallèle dans différentes gouttes de liquide d'intérêt captives sur ladite surface active dans la boîte.

5

30. Procédé d'électropolymérisation de molécules présentes dans un liquide d'intérêt, ledit procédé comprenant les étapes suivantes :

- répartition localisée de gouttes de liquide d'intérêt sur une surface active dans une boîte suivant le procédé de la revendication 1, et
- électropolymérisation dans ladite boîte, dans les gouttes dudit liquide d'intérêt, des molécules à polymériser.

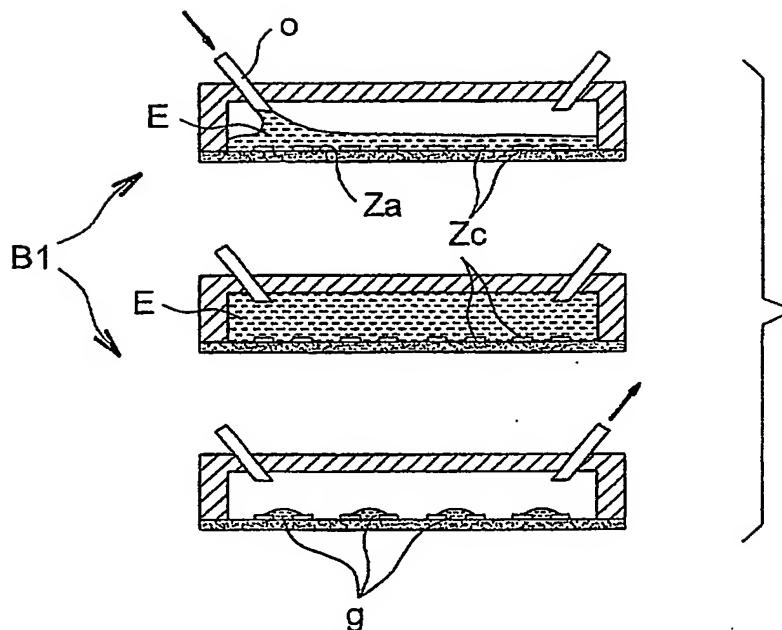


FIG. 1

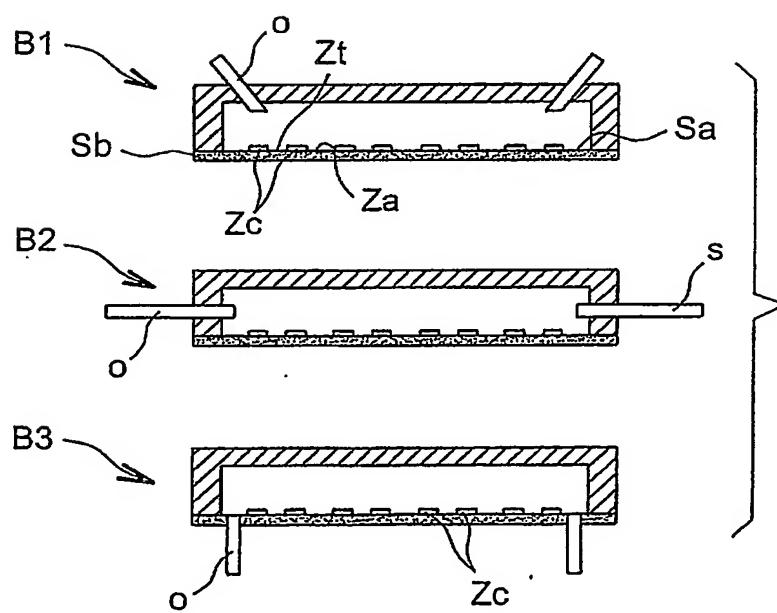


FIG. 2

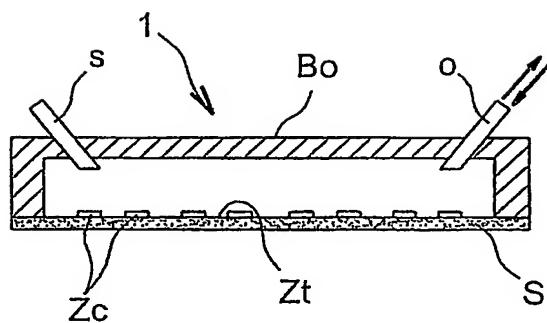


FIG. 3

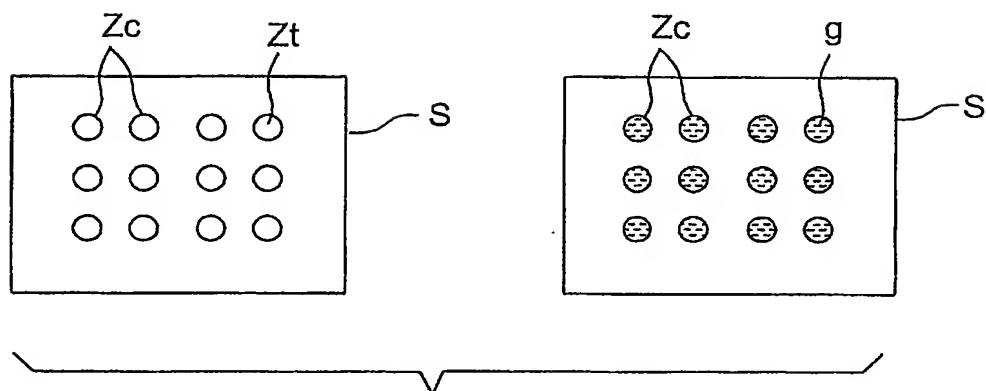


FIG. 4

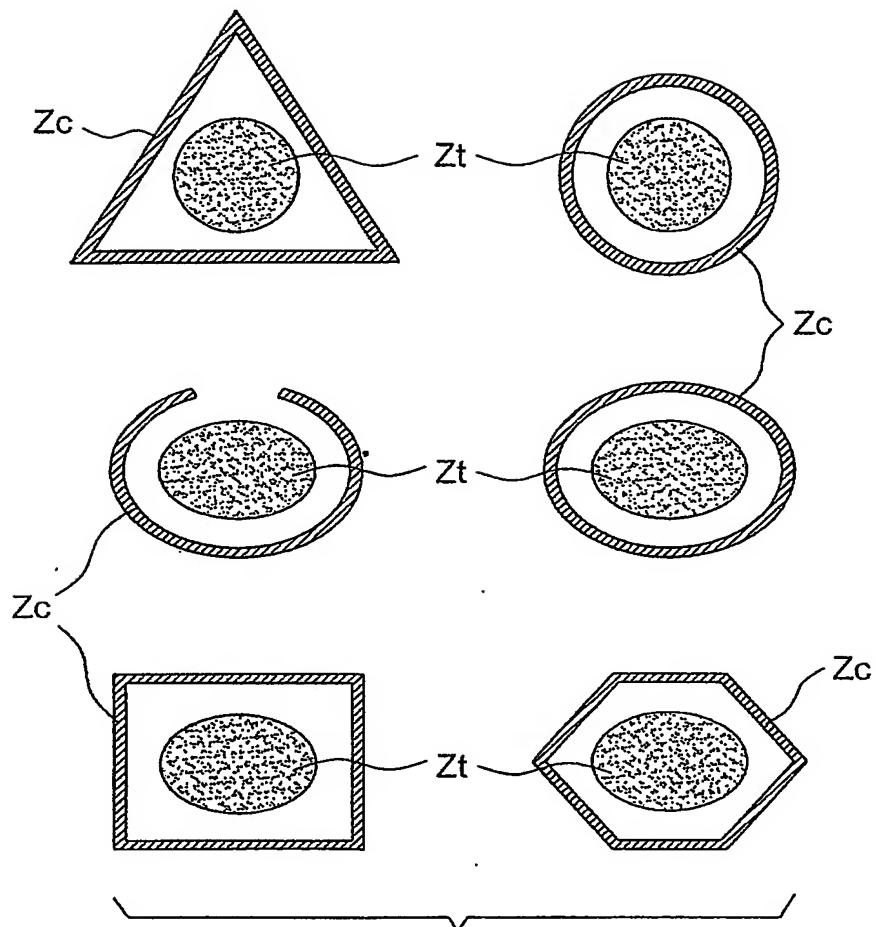


FIG. 5

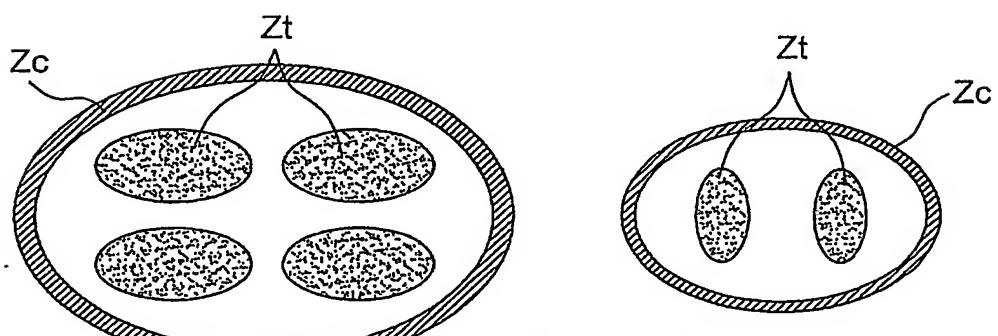


FIG. 6

4 / 5

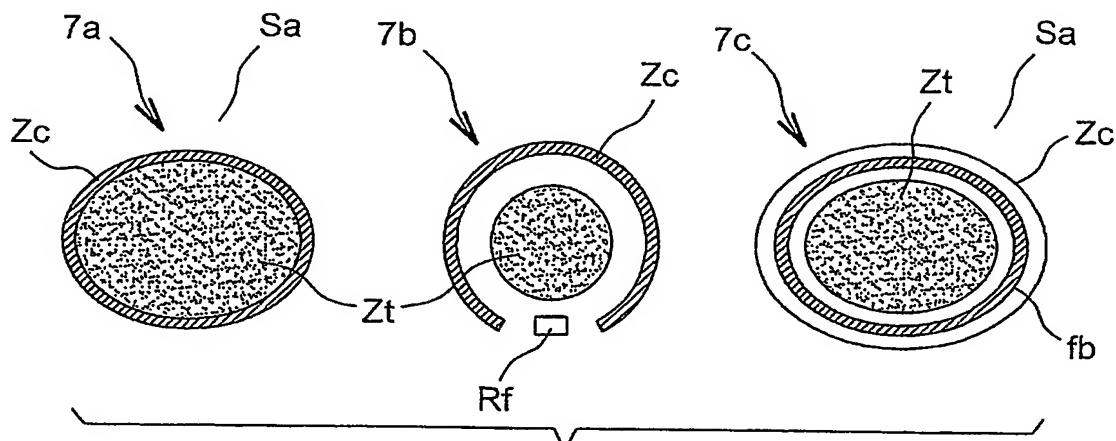


FIG. 7

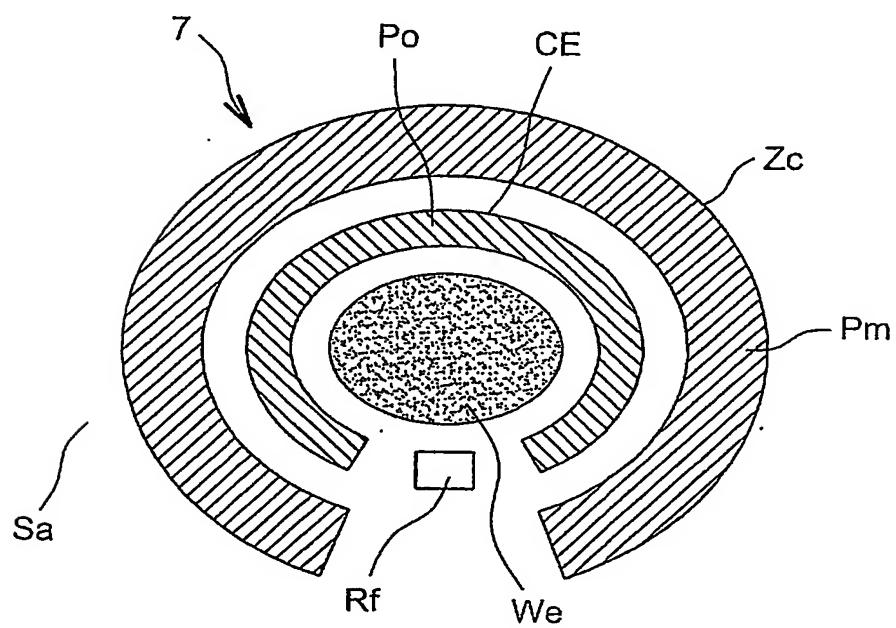
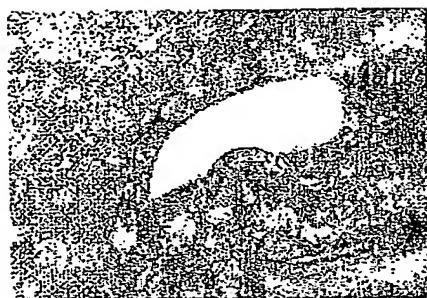
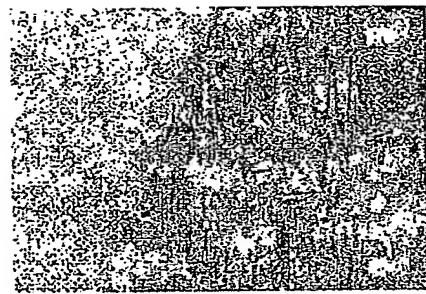


FIG. 8



(a)



(b)

FIG. 9

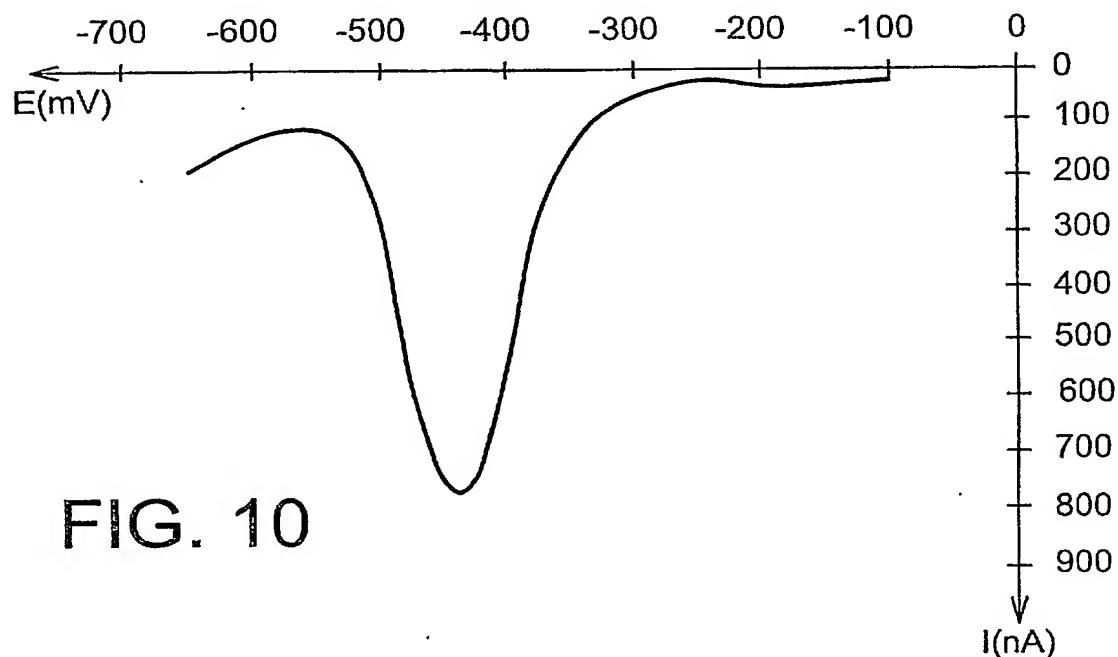


FIG. 10

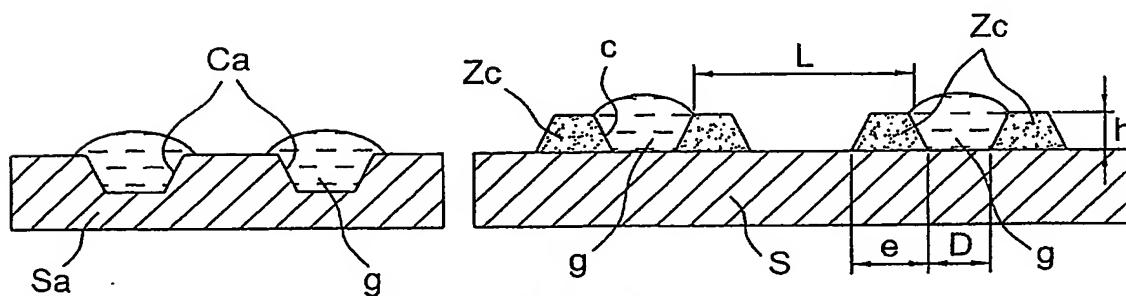


FIG. 11



## BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

### Désignation de l'inventeur

Vos références pour ce dossier	B 14404 EE DD 2564
N°D'ENREGISTREMENT NATIONAL	
TITRE DE L'INVENTION	
PROCEDE DE REPARTITION DE GOUTTES D'UN LIQUIDE D'INTERET SUR UNE SURFACE	
LE(S) DEMANDEUR(S) OU LE(S) MANDATAIRE(S):	
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S):	
Inventeur 1	
Nom	DELATTRE
Prénoms	Cyril
Rue	33, avenue Jeanne d'Arc
Code postal et ville	38100 GRENOBLE
Société d'appartenance	
Inventeur 2	
Nom	MARCHAND
Prénoms	Gilles
Rue	1, rue Traversine
Code postal et ville	38350 LA MURE
Société d'appartenance	
Inventeur 3	
Nom	POUTEAU
Prénoms	Patrick
Rue	10, allée Château Corbeau
Code postal et ville	38240 MEYLAN
Société d'appartenance	
Inventeur 4	
Nom	GINOT
Prénoms	Frédéric
Rue	32, rue Casimir Brenier
Code postal et ville	38120 SAINT EGREVE
Société d'appartenance	

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire. Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Signé par

Signataire: FR, Brevatome, J.Lehu

Emetteur du certificat: DE, D-Trust GmbH, D-Trust for EPO 2.0

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)